

**Technische Universität Darmstadt**  
**Institut für Botanik**



## **Expression und Analyse plasmodialer und antiplasmodialer Proteine in Pflanzen**

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines *Doctor rerum naturalium*

genehmigte Dissertation von

Apothekerin Simone Reichwein

aus Bad Nauheim

Berichterstatter (1. Referent): Prof. Dr. Heribert Warzecha

Mitberichterstatter (2. Referent): Prof. Dr. Adam Bertl

Tag der Einreichung: 21.11.2012

Tag der mündlichen Prüfung: 15.02.2013

Darmstadt 2013

D17



*„Eine wirklich gute Idee erkennt man daran, dass ihre  
Verwirklichung von vorne herein  
ausgeschlossen erscheint.“*

Albert Einstein (1879 - 1955)



Für Jubbe



## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>13</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>17</b>
<b>1.1 Die Tropenkrankheit Malaria.....</b>	<b>17</b>
<b>1.2 Parasitologie und Pathologie der Malaria .....</b>	<b>18</b>
1.2.1 Erreger der Malaria .....	18
1.2.2 Lebenszyklus von <i>Plasmodium</i> .....	18
1.2.3 Krankheitsbild der Malaria .....	20
<b>1.3 Maßnahmen zur Therapie, Kontrolle und Bekämpfung der Malaria.....</b>	<b>21</b>
1.3.1 Medikamentöse Therapie der Malaria und Resistenzentwicklung .....	21
1.3.2 Maßnahmen zur Kontrolle der Malaria .....	22
1.3.3 Impfstoffentwicklung .....	22
1.3.3.1 Transmissionsblockierende Impfstoffe .....	23
1.3.4 Neue Wege im Kampf gegen die Malaria.....	24
<b>1.4 Potentielle Kandidatenproteine und Zielstrukturen zur Inhibition der Entwicklung und Transmission von <i>Plasmodium</i>.....</b>	<b>25</b>
1.4.1 Das <i>Salivary Gland and Midgut Peptide 1</i> (SM1) .....	25
1.4.2 Das <i>Plasmodium Thrombospondin-related anonymous protein</i> (TRAP) und <i>Anopheles</i> Saglin .....	26
1.4.3 Pfs25 und Pfs28: Proteine der Ookineten-Oberfläche von <i>Plasmodium falciparum</i> .....	30
1.4.4 PcFK1 und PcFK2: Mikroproteine mit inhibitorischer Wirksamkeit auf <i>Plasmodium</i> .....	31
1.4.4.1 Cystin-Knoten-Mikroproteine (CKM) .....	33
<b>1.5 Produktion rekombinanter Proteine in Pflanzen .....</b>	<b>37</b>
1.5.1 Transiente Expression in <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	39
1.5.2 Expression rekombinanter Proteine im Phloemsaft und Nektar von <i>Ricinus communis</i> L.....	42

---

<b>1.6</b>	<b>Fragestellung .....</b>	<b>44</b>
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>47</b>
<b>2.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>47</b>
2.1.1	Technische Ausstattung .....	47
2.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	48
2.1.2.1	Chemikalien .....	48
2.1.2.2	Antibiotika .....	49
2.1.2.3	Nukleinsäuren, Nukleotide, Enzyme .....	49
2.1.2.4	Antikörper .....	50
2.1.2.5	Molekularbiologische Kits .....	50
2.1.2.6	Weitere Verbrauchsmaterialien .....	51
2.1.3	Material zur sterilen Kultivierung von Pflanzen .....	52
2.1.4	Wichtige Puffer und Lösungen .....	52
2.1.5	Nährmedien .....	54
2.1.5.1	Medien zur Anzucht von Bakterien .....	54
2.1.5.2	Medien zur Anzucht von Pflanzen .....	54
2.1.6	Bakterienstämme .....	55
2.1.7	Oligonukleotide .....	56
2.1.8	Plasmide .....	58
2.1.9	Genmaterial .....	61
2.1.10	Pflanzenmaterial .....	62
2.1.11	<i>Anopheles stephensi</i> .....	62
<b>2.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>63</b>
2.2.1	Molekularbiologische Methoden .....	63
2.2.1.1	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	63
2.2.1.2	Agarose-Gelelektrophorese .....	64
2.2.1.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen .....	64
2.2.1.4	DNA-Ligation .....	64
2.2.1.5	Identifizierung transformanter Zellen mittels PCR („Colony Screen“) .....	65
2.2.1.6	Plasmid-Isolierung (Plasmid Mini-Präparation) .....	66
2.2.1.7	Restriktionsverdau .....	66
2.2.1.8	Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration .....	67
2.2.1.9	Sequenzierung von Plasmid-DNA .....	67
2.2.2	Methoden zur Arbeit mit Bakterien .....	67



---

2.2.2.1	Herstellung der verwendeten Nährmedien.....	67
2.2.2.2	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	68
2.2.2.3	Herstellung kompetenter <i>A. tumefaciens</i> -Zellen .....	68
2.2.2.4	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	68
2.2.2.5	Transformation kompetenter <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -Zellen .....	69
2.2.2.6	Bestimmung der Optischen Dichte von Bakterienkulturen.....	69
2.2.2.7	Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung von Bakterien .....	69
2.2.2.8	Induktion der Proteinexpression mittels IPTG.....	70
2.2.3	Methoden zur Arbeit mit pflanzlichem Material.....	70
2.2.3.1	Herstellung der verwendeten Nährmedien.....	70
2.2.3.2	Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung von Pflanzen.....	70
2.2.3.3	Sterilisation von Samen.....	71
2.2.3.4	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> -vermittelte Transformation von Pflanzen .....	71
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden .....	73
2.2.4.1	Extraktion des löslichen Gesamtproteins aus Pflanzenmaterial .....	73
2.2.4.2	Reinigung des Gesamtproteins aus Blattmaterial .....	74
2.2.4.3	Reinigung von rekombinanten Proteinen aus Blattmaterial mittels IMAC (Profinia™ Protein Purification System) .....	75
2.2.4.4	Extraktion der löslichen Proteine aus <i>E. coli</i> -Zellen .....	76
2.2.4.5	Reinigung von rekombinanten Proteinen aus <i>E. coli</i> -Zellkultur mittels IMAC (Profinia™ Protein Purification System) .....	76
2.2.4.6	Quantifizierung von Proteinen .....	77
2.2.4.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	77
2.2.4.8	Bis-Tris Gelelektrophorese.....	79
2.2.4.9	Färben von Polyacrylamidgelen mit Coomassie .....	80
2.2.4.10	Färben von Polyacrylamidgelen mit Silbernitrat.....	80
2.2.4.11	Transfer von Proteinen und Immunodetektion (Immunoblot).....	81
2.2.5	Methoden der inhibitorischen Untersuchungen .....	82
2.2.5.1	Aufzucht von <i>Anopheles stephensi</i> -Moskitos.....	82
2.2.5.2	Untersuchungen zur Funktionalität der rekombinanten Proteine mittels Trypsin-Inhibition.....	83
3.	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>87</b>
3.1	<b>Heterologe Expression und Analyse der SM1-Peptid-Varianten .....</b>	<b>87</b>

---

3.1.1	Klonierung der SM1-Peptid-Varianten MCoTI-II-SM1 und AGRP-SM1 sowie der oktameren Variante [SM1] <sub>8</sub> .....	89
3.1.1.1	Klonierung des Expressionsvektors pGFP-6121 .....	90
3.1.1.2	Klonierung des Cystin-Knoten-Mikroproteins MCoTI-II-SM1 .....	91
3.1.1.3	Klonierung des Cystin-Knoten-Mikroproteins AGRP-SM1 .....	92
3.1.1.4	Klonierung des Cystin-Knoten Mikroproteins MCoTI-II .....	93
3.1.1.5	Klonierung der Cystin-Knoten-Mikroproteine MCOTI001 und MCOTI002 .....	95
3.1.1.6	Klonierung einer oktameren SM1-Peptid-Variante ([SM1] <sub>8</sub> ) .....	96
3.1.2	Transiente Expression der Varianten in <i>N. benthamiana</i> .....	98
3.1.2.1	Charakterisierung infiltrierter Pflanzen und Nachweis der Proteinsynthese .....	100
3.1.2.2	Proteinreinigung der CKM-Varianten aus <i>N. benthamiana</i> -Blattmaterial .....	102
3.1.3	Bakterielle Expression der Varianten in <i>E. coli</i> .....	105
3.1.3.1	Proteinreinigung der CKM-Varianten aus <i>E. coli</i> Origami .....	107
3.1.4	Aktivitätsbestimmung des heterolog exprimierten CKM MCoTI-II mittels Trypsin-Inhibitionstest .....	109
3.1.4.1	Aktivität der pflanzlich exprimierten MCoTI-II-Varianten .....	110
3.1.4.2	Aktivität der bakteriell exprimierten MCoTI-II-Variante .....	116
<b>3.2</b>	<b>Heterologe Expression und Analyse von Psalmopeotoxin I und -II, antiplasmodialer Peptide aus dem Toxin von <i>Psalmopoeus cambridgei</i> .....</b>	<b>120</b>
3.2.1	Klonierung der <i>pcf</i> k-Varianten .....	121
3.2.2	Transiente Expression von GFP:PcFK1 und -2 in <i>N. benthamiana</i> .....	122
3.2.2.1	Charakterisierung infiltrierter Pflanzen und Nachweis der Proteinsynthese .....	123
3.2.2.2	Proteinreinigung der PcFK-Varianten aus <i>N. benthamiana</i> -Blattmaterial .....	124
3.2.3	Bakterielle Expression von PcFK1 und -2 in <i>E. coli</i> .....	126
3.2.3.1	Proteinreinigung der Peptide aus <i>E. coli</i> Origami .....	127
<b>3.3</b>	<b>Heterologe Expression und Analyse von <i>Plasmodium</i> TRAP und <i>Anopheles</i> Saglin .....</b>	<b>128</b>
3.3.1	Klonierung der A-Domäne des <i>Plasmodium berghei</i> Thrombospondin Related Adhesive Protein (TRAP) .....	129
3.3.2	Klonierung von <i>Anopheles</i> Saglin .....	131
3.3.3	Transiente Expression der A-Domäne des <i>P. berghei</i> TRAP in <i>N. benthamiana</i> .....	132

---

3.3.3.1	Charakterisierung infiltrierter <i>N. benthamiana</i> -Pflanzen und Nachweis der Proteinsynthese .....	133
3.3.3.2	Proteinreinigung der <i>P. berghei</i> TRAP-A-Domäne aus <i>N. benthamiana</i> .....	134
3.3.4	Bakterielle Expression der A-Domäne des <i>P. berghei</i> TRAP und des <i>Anopheles</i> Oberflächenproteins Saglin .....	134
3.3.4.1	Proteinreinigung der TRAP-A-Domäne und des Saglin aus <i>E. coli</i> .....	135
<b>3.4</b>	<b>Heterologe Expression und Analyse von <i>Plasmodium falciparum</i> P25 und P28.....</b>	<b>138</b>
3.4.1	Klonierung der <i>Plasmodium falciparum</i> <i>pfs25</i> - und <i>pfs28</i> -Varianten .....	138
3.4.2	Bakterielle Expression von Pfs25 und Pfs28.....	140
3.4.2.1	Proteinreinigung von Pfs25 und Pfs28 aus <i>E. coli</i> .....	141
<b>3.5</b>	<b>Expression der potentiell inhibitorischen Proteine im Phloem-Saft von <i>Ricinus communis</i> L. durch <i>A. tumefaciens</i> vermittelten Gentransfer.....</b>	<b>142</b>
3.5.1	Klonierung der Varianten zur stabilen Expression in <i>Ricinus communis</i> L. ....	143
3.5.2	Regeneration und stabile Transformation von <i>Ricinus communis</i> L. mittels <i>Agrobacterium</i> unter Verwendung der Embryonen reifer Samen .....	146
3.5.3	Expression der GFP-Variante unter der Kontrolle des <i>AtSUC2</i> -Promotors .....	147
<b>3.6</b>	<b>Ergebnisse der inhibitorischen Untersuchungen mit <i>Anopheles stephensi</i> .....</b>	<b>148</b>
3.6.1	Verweildauer und Nachweisbarkeit der Proteine im Mosquito .....	148
3.6.2	Beurteilung der inhibitorischen Wirksamkeit der Kandidatenproteine in Fütterungsexperimenten an mit <i>Plasmodium berghei</i> infizierten <i>Anopheles stephensi</i> .....	151
3.6.2.1	Inhibitorische Wirksamkeit von GFP:PcFK1 und GFP:PcFK2 .....	152
3.6.2.2	Inhibitorische Wirksamkeit der SM1-Peptid-Varianten.....	153
3.6.2.3	Inhibitorische Wirksamkeit der plasmodialen Antigene Pfs25 und Pfs28 .....	156
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>159</b>
<b>4.1</b>	<b>Produktion potentiell inhibitorischer Kandidatenproteine und plasmodialer Antigene im bakteriellen und pflanzlichen Expressionssystem.....</b>	<b>161</b>
4.1.1	Produktion der SM1-Peptid-, PcFK1- und PcFK2-Varianten.....	161
4.1.1.1	Transiente Expression in <i>N. benthamiana</i> in Abhängigkeit vom subzellulären Targeting .....	162
4.1.1.2	Bakterielle Expression der Varianten als alternatives Produktionssystem.....	166

---

4.1.1.3	Nachweis der Aktivität der MCoTI-II-Varianten als Indikator für die Funktionalität der erzeugten Proteine .....	168
4.1.2	Produktion der <i>Plasmodium</i> TRAP-A-Domäne, von P25 und P28 sowie <i>Anopheles</i> Saglin .....	171
4.1.2.1	Transiente Expression plasmodialer Antigene .....	173
4.1.2.2	Bakterielle Expression der plasmodialen Antigene und des <i>Anopheles</i> Saglin .....	174
4.1.3	Expression der potentiell <i>Plasmodium</i> -inhibitorischen Proteine im Phloem-Saft von <i>Ricinus communis</i> .....	176
4.2	<b>Inhibitorische Wirksamkeit der Kandidatenproteine in Fütterungsexperimenten mit <i>Anopheles stephensi</i> .....</b>	<b>179</b>
4.3	<b>Fazit und Ausblick.....</b>	<b>185</b>
5.	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>187</b>
6.	<b>Summary .....</b>	<b>189</b>
7.	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>191</b>
8.	<b>Anhang .....</b>	<b>211</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>213</b>
	<b>Publikationsliste und Beiträge zu Tagungsbänden .....</b>	<b>215</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>217</b>
	<b>Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>219</b>

## Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
<i>A. t.</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> oder <i>Arabidopsis thaliana</i>
Ab	Antibody
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid-Hydrochlorid
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
Bis-Tris	Bis-(2-hydroxyethyl)-amino-tris-(hydroxymethyl)-methan
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
c	Konzentration
Carb	Carbenicillin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat
CKM	Cystin-Knoten-Mikroprotein
cm	Zentimeter
C-Terminus	Carboxyterminus
cv.	Cultivar
Da	Dalton
dd H <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dpp	Tage nach der Reinigung ( <i>days post purification</i> )
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FG	Frischgewicht
for	<i>forward</i>
g	Gramm
Gent	Gentamicin
<i>gfp</i>	Gen des Grün fluoreszierenden Proteins
GFP	Grün fluoreszierendes Protein

---

h	Stunde(n)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IBA	Indol-3-Buttersäure
ICK	<i>Inhibitor Cystine Knot</i>
IgG	Immunglobulin G
IMAC	<i>Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography</i>
IPTG	Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranosid
Kan	Kanamycin
Kap.	Kapitel
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
komp.	kompetitiv
l	Liter
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LEW-Puffer	Lysis-Equilibration-Wasch-Puffer
LGP	Lösliches Gesamtprotein
M	molar
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
min	Minute
MKS	Multiple Klonierungsstelle
ml	Milliliter
mM	millimolar
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
MOPS	3-( <i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
M <sub>R</sub>	relative Molekülmasse
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
N. N.	<i>Non nominatus</i>
NAA	1-Naphthylessigsäure
ng	Nanogramm
Ni	Nickel
nm	Nanometer
<i>nos</i>	Gen der Nopalinsynthase
<i>nptII</i>	Gen der Neomycinphosphotransferase II
N-Terminus	Aminoterminal
o. g.	oben genannte
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>Phosphate buffered saline</i> )

---

PBST	Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween 20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
p. i.	Nach der Infektion, - Infiltration, - Induktion ( <i>post infection, post infiltration, post induction</i> )
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
<i>Prrn</i>	16srRNA-Promotor
<i>psbA</i>	Gen des D1-Proteins
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rev	<i>reverse</i>
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>Sodium dodecyl sulfate</i> )
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBV	Transmissionsblockierender Impfstoff ( <i>transmission blocking vaccine</i> )
TCA	Trichloressigsäure
TDZ	Thidiazuron
TE	Tris-EDTA
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
Tricin	<i>N</i> -[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-glycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRX	Thioredoxin
U	Spannung oder <i>Unit</i>
UTR	untranslatierte Region
V	Volt oder Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp



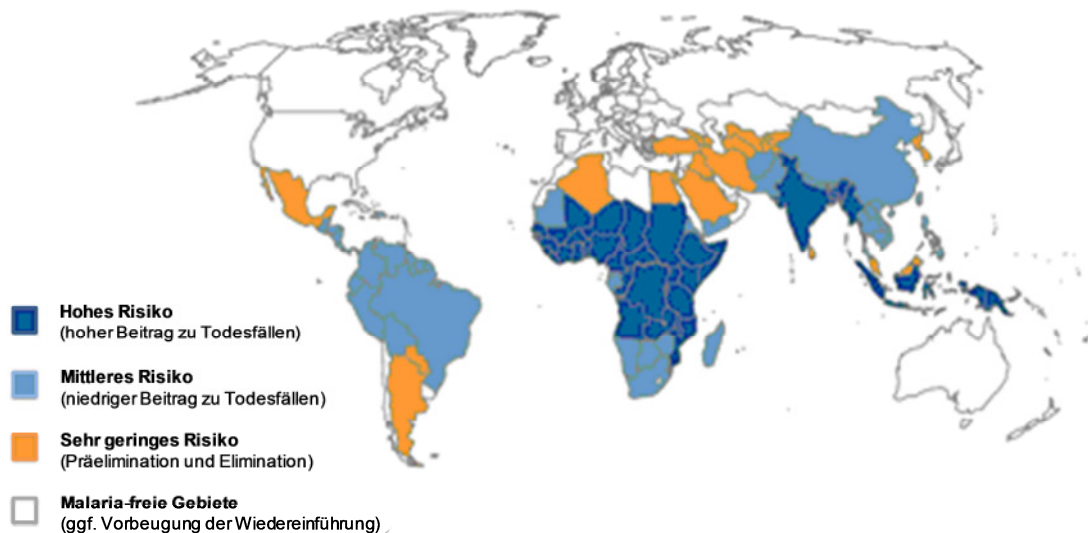


## 1. Einleitung

### 1.1 Die Tropenkrankheit Malaria

Malaria ist eine durch einzellige, eukaryotische Parasiten der Gattung *Plasmodium* (Stamm Apicomplexa, Klasse Haematozoa, Ordnung Haemosporida) verursachte Infektionskrankheit, die durch den Stich einer infizierten weiblichen Stechmücke der Gattung *Anopheles* (Ordnung Diptera, Unterordnung Nematocera, Familie Culicidae) übertragen wird.

Malaria ist weltweit neben HIV und Tuberkulose eine der häufigsten Infektionskrankheiten und tritt vor allem in den tropischen und subtropischen Regionen der Erde in etwa 100 Ländern endemisch auf (Abb. 1.1). Nach Schätzungen des *World Malaria Report 2011* (WHO, 2012a) erkrankten im Jahre 2010 etwa 216 Millionen Menschen an Malaria, wobei etwa 655.000 Menschen starben, darunter vor allem afrikanische Kinder unter fünf Jahren. Dabei ist die Mortalitätsrate laut WHO durch die Intensivierung der Bekämpfungsmaßnahmen und den Globalen Hilfsfond seit dem Jahr 2000 weltweit um mehr als 25 % gesunken, allein in Afrika sogar um 33 % (WHO, 2012b).



**Abbildung 1.1. Geographische Verteilung der Malaria unter Angabe des Risikos einer Infektion.** Etwa 90 % der Todesfälle treten in Afrika auf, nahezu 86 % der Todesfälle weltweit betreffen Kinder unter fünf Jahren (Abbildung modifiziert nach [1]).

## 1.2 Parasitologie und Pathologie der Malaria

### 1.2.1 Erreger der Malaria

Die Krankheit wird durch den Parasit *Plasmodium* verursacht, wobei fünf Arten humanpathogen sind: *P. falciparum* (Erreger der *Malaria tropica*), *P. vivax* und *P. ovale* (Erreger der *Malaria tertiana*), sowie *P. malariae* (Erreger der *Malaria quartana*). Dabei sind *P. falciparum* und *P. vivax* am weitesten verbreitet, *P. falciparum* als Erreger der *Malaria tropica* gilt jedoch als die gefährlichste Form und ist für über 90 % der Todesfälle verantwortlich (Schwartz *et al.*, 2012). In den letzten Jahren sind zudem auch Krankheitsfälle bei Menschen aufgetreten, die durch *Plasmodium knowlesi* hervorgerufen wurden, eine bislang nur für Affen pathogene Spezies, die in bewaldeten Regionen Süd-Ost-Asiens beheimatet ist (Pain, 2008). Neben den humanpathogenen Erregern existieren mit insgesamt mehr als 100 *Plasmodium*-Arten zahlreiche säugetierpathogene Arten, wie z. B. *P. berghei* und *P. yoelii*, die Nagetiere befallen können, aber auch Arten, die Vögel oder Reptilien infizieren können, sind bekannt.

### 1.2.2 Lebenszyklus von *Plasmodium*

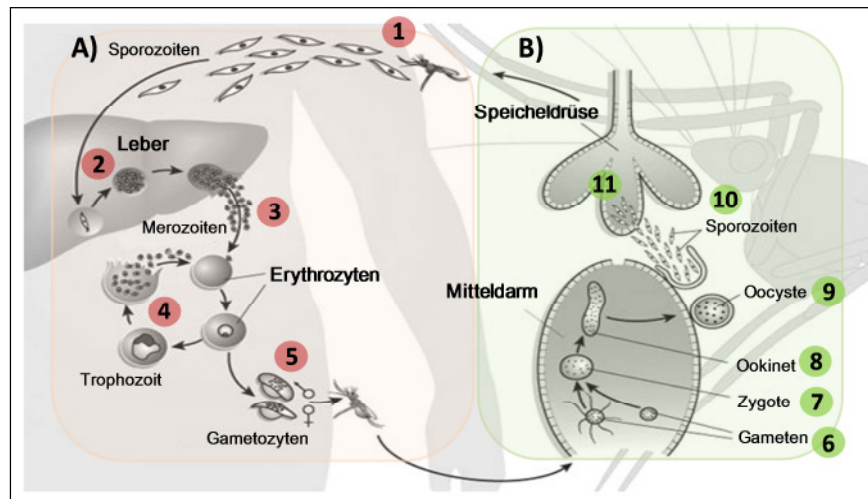
*Plasmodium* durchläuft einen komplexen Entwicklungszyklus, der durch einen Wirtswechsel und den Vollzug zahlreicher verschiedener Stadien im Wirbeltier (asexuelle Phase/Schizogonie, Abb. 1.2, A) und in der Stechmücke (sexuelle Phase/Sporogonie, Abb. 1.2, B) gekennzeichnet ist (Wirth, 2002). Während einer Blutmahlzeit überträgt dabei eine weibliche infizierte *Anopheles*-Mücke Sporozoiten von *Plasmodium* auf den Wirbeltier-Wirt (Abb. 1.2, (1)). Die Sporozoiten gelangen vom Subkutangewebe über den Blutstrom innerhalb von Minuten zur Leber und befallen dort die Hepatozyten (Abb. 1.2, (2); Frevert, 2004).

Innerhalb der Hepatozyten entwickeln sich durch asexuelle Vermehrung über das Trophozoiten-Stadium Leber-Schizonten, die tausende Merozoiten enthalten. Der Schizont enthält dabei mehrere Zellkerne; die Tochterkerne entwickeln und organisieren sich anschließend zu einzelnen Merozoiten. In Abhängigkeit von der jeweiligen *Plasmodium*-Art dauert diese prä- oder exoerythrozytäre Schizogoniephase etwa zwei bis 16 Tage (Prudencio *et al.*, 2006). Bei *P. vivax* und *P. ovale* kann ein Teil der Schizonten als sogenannte Hypnozoiten in einer Art Ruhephase mehrere Monate oder sogar Jahre unentdeckt vom Immunsystem des Wirtes in den Hepatozyten persistieren und dann zu den für die *Malaria tertiana* charakteristischen Rückfällen führen (Krotoski *et al.*, 1982).

Durch die Ruptur der Hepatozyten gelangen die Merozoiten in den Blutstrom, wo sie sich über spezifische Oberflächenrezeptoren an Erythrozyten heften und diese invadieren (Abb. 1.2, (3)). In den Erythrozyten erfolgt die Entwicklung innerhalb einer parasitophoren Vakuole (Lingelbach & Joiner, 1998) über das Ring-Stadium zu Trophozoiten. Nach 22 bis 72 Stunden sind am Ende der erythrozytären Schizogoniephase reife Schizonten entstanden, aus denen beim Zerfall der Erythrozyten erneut Merozoiten entlassen werden, die weitere Erythrozyten befallen können (Abb. 1.2, (4)). Innerhalb der erythrozytären Phase differenziert zudem ein Teil der Parasiten zu

geschlechtlichen Formen, den Gametozyten, die die Vorstufen der Gameten bilden (Abb. 1.2, (5)).

Das Hämoglobin der Erythrozyten dient *Plasmodium* als Proteinquelle. Da *Plasmodium* jedoch das dabei anfallende Häm nicht verwerten kann und dieses zudem toxisch für den Parasiten ist, wird es zum unlöslichen Abbauprodukt Hämozin polymerisiert, das in den intraerythrozytären Vakuolen akkumuliert und als Malariapigment bezeichnet wird (Goldberg & Slater, 1992).



**Abbildung 1.2. Entwicklungszyklus von *Plasmodium*. Weitere Erklärungen im Text.**  
Abbildung verändert nach Wirth, 2002.

Wenn die *Anopheles*-Mücke während einer Blutmahlzeit schließlich die reifen Gametozyten aufnimmt, kann *Plasmodium* im Mitteldarm des Insekts seine Entwicklung fortsetzen (Beier, 1998). Die aufgenommenen Gametozyten differenzieren im Darm der Mücke zu haploiden Gameten (Abb. 1.2, (6)), wobei sich der weibliche Gametozyt zu einem kugelförmigen Makrogameten entwickelt. Die männlichen Gametozyten differenzieren in einem als Exflagellation bezeichneten Prozeß zu begeißelten Mikrogameten, die eine entsprechende Beweglichkeit besitzen. Die Verschmelzung eines Mikrogameten mit einem Makrogameten resultiert in einer diploiden Zygote (Abb. 1.2, (7)), die innerhalb des Mitteldarms zu einem motilen Ookineten differenziert (Abb. 1.2, (8)). Der Ookinete penetriert das Epithelium des Mitteldarms und entwickelt sich im extrazellulären Raum zu einer Oozyste (Abb. 1.2, (9); Han *et al.*, 2000). In den Oozysten werden in Abhängigkeit von der *Plasmodium*-Art und Temperatur innerhalb von etwa 14 Tagen nach der Blutmahlzeit tausende Sporozoiten gebildet. Die Sporozoiten werden in das Hämozel der Mücke entlassen und wandern zur Speicheldrüse (Abb. 1.2, (10)). Dort gelangen sie über die Acinar-Zellen in den sekretorischen Raum der Drüse, wo sie mehrere Wochen überdauern und bei einer erneuten Blutmahlzeit der Mücke mit dem Speichel auf einen weiteren Wirbeltier-Wirt übertragen werden können (Matuschewski, 2006).

### 1.2.3 Krankheitsbild der Malaria

*Plasmodium falciparum* und, jedoch in weitaus geringerem Maße, *Plasmodium vivax* tragen den größten Teil zur Morbidität und Mortalität der Malaria bei (Mendis *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 2002). Im menschlichen Wirt vermehrt sich *Plasmodium* während der exoerythrozytären Phase zunächst klinisch und diagnostisch unauffällig in den Hepatozyten, um anschließend Erythrozyten zu befallen und die Blutstadien zu durchlaufen. Diese erythrozytäre Phase ist für alle mit einer Malariaerkrankung assoziierten typischen klinischen Symptome und fatalen Krankheitsverläufe verantwortlich.

Dabei kommt es während der erythrozytären Phase durch das Wachstum des Parasiten zu einem hohen Abbau intrazellulärer Proteine, besonders des Hämoglobins, und der letztendlichen Ruptur der Zellen, wodurch Cytokine u. a. Faktoren freigesetzt werden. Darüber hinaus verändert sich die Erythrozytenmembran und die Zelle weist eine verminderte Deformierbarkeit auf. Hier spielt bei einer *Malaria tropica* das *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein-1 (PfEMP-1) eine entscheidende Rolle, da es, exprimiert auf der Oberfläche der infizierten Erythrozyten, die Anheftung an Rezeptormoleküle des venösen und kapillären Endothels vermittelt (Baruch, 1999; Chen *et al.*, 2000; Newbold *et al.*, 1999). Diese sogenannte Zytoadhäsion schützt den Parasiten vor der Elimination durch die Milz und kann gleichzeitig zur Sequestrierung infizierter Erythrozyten in den Kapillargefäßen verschiedener Organe führen (Miller *et al.*, 2002). PfEMP-1 wird durch die große *var*-Gen-Familie kodiert, die für die klonale Antigenvielfalt verantwortlich ist und eine zentrale Rolle in der Pathogenese von *P. falciparum* spielt (Baruch *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 1995; Su *et al.*, 1995). Als Rezeptoren für PfEMP-1 wurden insbesondere das *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) im Gehirn, Chondroitinsulfat A (CSA) in der Plazenta und CD36 in weiteren Organen beschrieben (Miller *et al.*, 2002; Newbold *et al.*, 1999; Ockenhouse *et al.*, 1991). Die Adhärenz der Erythrozyten untereinander und an das Endothel der betroffenen Gewebe kann eine Störung der Mikrozirkulation und damit eine verminderte Sauerstoffversorgung von beispielsweise Gehirn, Lunge, Niere und Leber bewirken, die für die schweren Symptome und komplizierten Verläufe der *Malaria tropica* verantwortlich ist. Charakteristisch für eine komplizierte *M. tropica* sind Bewusstseinsstörungen bis hin zum Koma, oft verbunden mit Krampfanfällen (zerebrale Malaria), Nieren- und Leberfunktionsstörungen, Laktatazidose, ARDS (*adult respiratory distress syndrome*) sowie eine ausgeprägte hämolytische Anämie (Miller *et al.*, 2002; N. N., 2008)

Die akute Infektion ist gekennzeichnet durch ein breites Spektrum an Symptomen, die frühestens sechs Tage nach dem Stich einer infizierten *Anopheles*-Mücke auftreten. Bei allen Malariaformen treten dann zunächst allgemeines Unwohlsein, Kopf-, Glieder- und Muskelschmerzen sowie Bauchschmerzen, ggf. mit Erbrechen, und Fieber auf. Bei der *Malaria tropica* sind die Fieberschübe unregelmäßig, wohingegen schubartiges Fieber in einem Rhythmus von 48 – bzw. 72 Stunden auf eine Infektion mit *P. vivax* oder *P. ovale* (*Malaria tertiana*) bzw. mit *P. malariae* (*M. quartana*) hinweist.

Der Verlauf der *M. tertiana* ist meistens verhältnismäßig mild mit weniger schwerwiegenden Symptomen. *P. vivax* und *P. ovale* infizieren beide nur Retikulozyten (junge Erythrozyten), wodurch die Parasitämie im Blut relativ gering ist. Eine Sequestration der Erythrozyten mit Störungen der Mikrozirkulation tritt nur selten auf. Durch das Vorkommen von Hypnozoiten in der Leber kann es allerdings noch nach Jahren zu Rückfällen kommen.

Eine durch *P. malariae* verursachte *M. quartana* zeichnet sich durch einen in der Regel harmlosen Verlauf aus. *P. malariae* infiziert hauptsächlich alte Erythrozyten, sodass hier ebenfalls eine nur geringe Parasitämie im Blut resultiert. Eine *M. quartana* kann jedoch aufgrund persistierender erythrozytärer Formen innerhalb von mehreren Jahrzehnten ebenfalls noch zu Rückfällen führen (Kretschmer *et al.*, 1996; N. N., 2008).

Rechtzeitig diagnostiziert und adäquat therapiert führt eine Malariainfektion meist nicht zu lebensbedrohlichen Komplikationen, wobei der Auslöser des Übergangs von einer milden Verlaufsform zu einer komplizierten Malaria noch nicht vollständig verstanden wurde und eine Infektion dabei besonders gefährlich für Kleinkinder bis fünf Jahre und Frauen während der ersten Schwangerschaft ist (Tuteja, 2007).

### 1.3 Maßnahmen zur Therapie, Kontrolle und Bekämpfung der Malaria

#### 1.3.1 Medikamentöse Therapie der Malaria und Resistenzentwicklung

Eine frühe Diagnose verbunden mit einer adäquaten Therapie der Infektion kann nicht nur heilen und gegebenenfalls Leben retten, sondern trägt auch zur Verminderung der Übertragung bei. Zur Therapie der Malaria stehen verschiedene Wirkstoffklassen zur Verfügung: neben Aminochinolinen, Arylaminoalkoholen und Antifolaten kommen Artemisinin-Derivate, Atovaquon sowie einige Antibiotika zum Einsatz. Eine ausführliche Beschreibung der Wirk- und Resistenzmechanismen der verschiedenen Malariatherapeutika geben Stich und Schlitzer (2008), Schlitzer (2009) sowie Hobbs und Duffy (2011). Die meisten Wirkstoffe sind Blutschizontozide, wirken also gegen die Blutstadien des Parasiten. Dabei ist *Plasmodium* aber, gerade bei inadäquater Therapie, in der Lage relativ schnell Resistenzen gegen die verfügbaren Wirkstoffe zu entwickeln (Fidock, 2010). So ist *P. falciparum* in vielen Teilen der Welt resistent gegenüber Sulfadoxin/Pyrimethamin (Fansidar®) und Chloroquin, die einst am häufigsten verwendeten und erschwinglichsten Arzneistoffe (Ridley, 2002). Auch gegenüber Mefloquin, einem wichtigen und immer noch effizienten Wirkstoff, bestehen vor allem in Südostasien, aber auch in Afrika und Südamerika Resistenzen (Tuteja, 2007; Schlitzer, 2010). Um das Problem der Resistenzbildung zu umgehen und die Anwendbarkeit der vorhandenen Stoffe zu verlängern, kommen vor allem in China, Südostasien und Afrika vermehrt Artemisinin-basierte Präparate zum Einsatz (Tuteja, 2007; Schlitzer, 2010). Artemisinin als Inhaltsstoff des einjährigen Beifuß (*Artemisia annua*) ist äußerst wirksam, besitzt jedoch eine schlechte Löslichkeit. Daher werden partialsynthetische Derivate des Dihydroartemisinin (Artesunat, Artemether, u. a.) angewandt, die aufgrund ihrer geringen Halbwertszeit in Kombination mit verschiedenen anderen Wirkstoffen längerer

Halbwertszeit (z. B. Lumefantrin, Mefloquin, Amodiaquin, Sulfadoxin/Pyrimethamin) kombiniert werden (Hobbs & Duffy, 2011). Diese im Rahmen der sogenannten *Artemisinin-based combination therapy* (ACT) eingesetzten Präparate (z. B. Riamet®) werden von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) als Mittel der ersten Wahl für die Therapie der Malaria empfohlen (WHO, 2012b). Doch auch gegenüber den Artemisinin-Derivaten wurden 2009 aus Teilen Kambodschas und Thailands bereits Resistenzen gemeldet, die heute auch in Myanmar und Vietnam anzutreffen sind (WHO, 2012b). Gerade die besorgniserregende Ausbreitung von Resistenzen gegenüber den vorhandenen Arzneistoffen, bei der eine inadäquate Therapie der Infektion eine wichtige Rolle spielt, ist ein enormes Problem bei der Kontrolle der Krankheit und mitunter ein Grund für die verstärkte Suche nach neuen Strategien im Kampf gegen die Malaria.

### 1.3.2 Maßnahmen zur Kontrolle der Malaria

Neben der medikamentösen Behandlung ist die effiziente Vektorkontrolle eines der wesentlichen Mittel, um die Übertragung der Infektion zu reduzieren. Dabei gehören neben dem Management der Umweltbedingungen (z. B. Reduktion der potentiellen Brutstätten) Insektizid-beschichtete Moskitonetze (*Insecticide-treated mosquito nets*, ITNs) und die Besprühung der Wohnräume mit Insektiziden (*Indoor residual spraying*, IRS) zu den wichtigsten Maßnahmen. Allerdings sind auch hier vermehrt Resistenzen zu beobachten und die Moskitos zunehmend unempfindlich gegenüber den eingesetzten Insektiziden. Glücklicherweise geht diese Resistenzentwicklung (noch) nicht mit einer verminderten Effizienz einher, so dass die auf Insektiziden basierenden Maßnahmen immer noch sehr wirksam sind. Dennoch wird intensiv an der Entwicklung neuer, alternativer Insektizide gearbeitet, da gerade in Ländern wie Afrika und Indien mit einer hohen Transmissionsrate eine zunehmende Resistenzentwicklung sehr beunruhigend ist (WHO, 2012b).

Nach Jahrzehnten der Vernachlässigung wurden in den letzten Jahren eine Reihe internationaler Initiativen begründet, die der Malaria den Kampf angesagt haben. Dazu gehören u. a. neben dem Programm der WHO, *Roll Back Malaria*, auch die *Multilateral Initiative on Malaria* (MIM), das *Medicines for Malaria Venture* (MMV), die *PATH Malaria Vaccine Initiative* (MVI) und der *Global Fund to fight AIDS, TB and Malaria*. Dank massiver finanzieller Unterstützung, nicht zuletzt von der *Bill & Melinda Gates Foundation* v. a. für die *PATH Malaria Vaccine Initiative*, und einiger technologischer Innovationen existiert heute auch eine Vielzahl an verschiedenen Projekten zur Entwicklung eines Malaria-Impfstoffes.

### 1.3.3 Impfstoffentwicklung

Die unaufhaltsame Ausbreitung von Resistenzen sowohl gegenüber den verfügbaren Arzneistoffen als auch den eingesetzten Insektiziden erhöht den Druck auf die Wissenschaft, schnellstmöglich eine effektive Impfung zu entwickeln. Seit Mitte der 1980er Jahre arbeiten Forscher an der Entwicklung eines Impfstoffes gegen Malaria, wobei der anfängliche Optimismus durch die auftretenden Probleme angesichts der genetischen Variabilität (und der daraus resultierenden Antigenvielfalt) des Parasiten zusammen mit der Schwierigkeit, eine lebenslange Immunität zu erzeugen, abgeschwächt wurde (Graves & Gelband, 2006). Doch obwohl es noch

keine zugelassene Vakzine gibt, sind derzeit dank der aufgestockten Fördergelder mehrere vielversprechende Kandidaten in der Entwicklung (Schwartz *et al.*, 2012). Diese Impfstoffkandidaten umfassen rekombinante Proteine, synthetische Peptide, DNA-Impfstoffe, inaktivierte Parasiten und Impfstoffe, die eine Mischung aus einer Vielzahl an potentiellen Antigenen enthalten (Graves & Gelband, 2006). Dabei liegt angesichts der sehr hohen Anzahl an Todesfällen der Fokus auf *Plasmodium falciparum* als gefährlichstem Erreger (Schwartz *et al.*, 2012).

Einer dieser Impfstoffkandidaten gegen *P. falciparum* befindet sich in Phase III der klinischen Prüfung am Menschen und wird derzeit in einer großen Studie an elf Orten in sieben afrikanischen Ländern getestet. Abschließende Ergebnisse werden im Jahr 2014 erwartet, aber ersten Ergebnissen zufolge reduziere der Impfstoff das Auftreten einer klinischen Malaria um 55 % innerhalb von 12 Monaten nach der dritten Impfstoffdosis (Agnandji *et al.*, 2011; Schwartz *et al.*, 2012; White, 2011). RTS,S/AS01E (GlaxoSmithKline, GSK) ist bislang der einzige Impfstoffkandidat, der dieses Stadium der klinischen Prüfung erreicht hat und wäre zudem die erste Vakzine gegen einen Parasiten des Menschen überhaupt. Bei RTS,S/AS handelt es sich um eine auf einem prä-erythrozytären Antigen, dem Sporozoiten-Hüllprotein (*circumsporozoite protein*, CSP), basierende Vakzine, die aus Sequenzabschnitten des CSP fusioniert an das Oberflächenprotein des Hepatitis B-Virus besteht (HBsAg) und die zur Verstärkung der Immunantwort mit einem von GSK entwickelten Adjuvanssystem (AS01E) kombiniert ist. CSP wird während des Sporozoiten-Stadiums und der frühen Leber-Stadien der Infektion exprimiert (Coppi *et al.*, 2011), wobei es an der Adhäsion der Sporozoiten an die Hepatozyten und deren Invasion beteiligt ist. RTS,S wurde durch eine Partnerschaft von GSK mit der *PATH Malaria Vaccine Initiative*, die von der *Bill & Melinda Gates Foundation* finanziell unterstützt wird, entwickelt (Schwartz *et al.*, 2012). Die klinische Entwicklung von RTS,S wurde zuvor ausführlich beschrieben (Ballou, 2009; Casares *et al.*, 2010; Cohen *et al.*, 2010). Eine detaillierte Übersicht über die Projekte zur Impfstoffentwicklung liefern Schwartz *et al.* (2012).

#### 1.3.3.1 Transmissionsblockierende Impfstoffe

Als Angriffsziele der Impfstoffentwicklung werden grundsätzlich vier Stadien des Lebenszyklus von *Plasmodium* angesehen: i) die Sporozoiten, die durch den Stich der Mücke übertragen wurden, vor der Infektion der Hepatozyten; ii) die Merozoiten, die sich in den Hepatozyten entwickeln, vor der Invasion der Erythrozyten; iii) die Merozoiten während der Invasion oder Entwicklung im Erythrozyten, und iv) die Gametozyten, die nach einer Blutmahlzeit im Moskito aus den Erythrozyten freigesetzt werden. Die ersten beiden Stadien werden meist als prä-erythrozytäre Stadien zusammengefasst und darauf basierende Impfstoffe sollen einer Infektion vollständig vorbeugen. Impfstoffe gegen das dritte Stadium, auch als Blut-Stadium bezeichnet, sollen die Parasitämie reduzieren oder ganz eliminieren, so dass sich das klinische Bild einer Malaria nicht entwickeln kann. Zielt ein Impfstoffkandidat auf das vierte Stadium, also auf die Sexualstadien von *Plasmodium*, so kann die Entwicklung im Moskito und damit die Übertragung des Parasiten durch die Mücke verhindert werden (Graves & Gelband, 2006). Daher bezeichnet man diese Gruppe als transmissionsblockierende Impfstoffe (*transmission-blocking vaccines*,

TBVs; Carter *et al.*, 2000; Kaslow, 1997). Hier sollen die durch die Impfung gebildeten spezifischen Antikörper von *Anopheles* bei der Blutmahlzeit aufgenommen werden und im Darm der Stechmücke durch die Bindung an die Oberflächenproteine von Gametozyten, Gameten, Zygoten und/oder Ookineten die Entwicklung von Oocysten und infektiösen Sporozoiten inhibieren (Aly *et al.*, 2009).

Die Zielantigene für transmissionsblockierende Impfstoffe werden in zwei Gruppen unterteilt: i) parasitäre Oberflächenproteine vor der Fertilisation, also die Antigene exprimiert von männlichen und weiblichen Gametozyten und Gameten wie z. B. P48/45 und P230 (Sauerwein & Eling, 2002), und ii) solche nach der Fertilisation. Zu dieser Gruppe gehören die Antigene von Zygoten und reifenden Ookineten wie z. B. P25 und P28 (Kap. 1.4.3; Kumar & Carter, 1985; Paton *et al.*, 1993; Vermeulen *et al.*, 1985).

Transmissionsblockierende Impfstoffe sind für die beiden gefährlichsten humanpathogenen *Plasmodium*-Arten, *P. falciparum* und *P. vivax*, in der Entwicklung und mindestens eine klinische Studie der Phase I ist angelaufen (Carter, 2001; Schwartz *et al.*, 2012; Tsuboi *et al.*, 2003).

Eine Übersicht der Entwicklungen der letzten Jahre bieten beispielsweise Carter (2001), Kaslow (2002) und Schwartz *et al.* (2012).

### 1.3.4 Neue Wege im Kampf gegen die Malaria

Die Übertragung der Krankheit lässt sich heute zwar auch ohne verfügbaren Impfstoff auf verschiedenem Wege eindämmen, eine vollständige Auslöschung der Malaria dürfte sich aber, wenn überhaupt, wohl nur durch die Kombination der verschiedenen Maßnahmen wie Vektorkontrolle, medikamentöse Therapie und eine hochwirksame Impfung, die die Transmissionsrate drastisch reduziert, realisieren lassen (Schwartz *et al.*, 2012). Da Malaria heute eine Krankheit der ärmeren und unterentwickelten Regionen der Erde mit mangelhaften Gesundheitsstrukturen ist, ist jedoch gerade die Umsetzung der verfügbaren Maßnahmen, auch eine flächendeckende Immunisierung der von Malaria bedrohten Menschen, ein großes Problem. Darüber hinaus ist die zunehmende Resistenzentwicklung gegenüber den verfügbaren Malariatherapeutika und Insektiziden besorgniserregend.

Daher werden auf der Suche nach neuen Möglichkeiten zunehmend auch innovative Ideen und ungewöhnliche Strategien diskutiert und verfolgt, wie etwa die Freisetzung transgener Moskitos, die gegenüber einer Infektion mit *Plasmodium* resistent sind. So konnten beispielsweise Ito *et al.* (2002) zeigen, dass durch transgene, das inhibitorische *salivary gland and midgut peptide 1*-exprimierende Moskitos die Entwicklung von *Plasmodium* inhibiert und so die Vektor-Kompetenz und damit die Übertragung der Malaria drastisch reduziert werden konnte. Dabei wäre durch die Verwendung einer multiplen Anzahl an Genen, deren antiplasmodiale Wirksamkeit innerhalb der transgenen Moskitos auf verschiedenen Mechanismen basiert, die Entstehung von Resistenzen relativ unwahrscheinlich (James, 2003).

In den letzten Jahren wurden zudem verschiedene Peptide, Proteine und Antikörper identifiziert, die auf unterschiedliche Art und Weise die Transmission von *Plasmodium* verhindern oder zumindest reduzieren können. Darüber hinaus können sowohl ein besseres Verständnis der



Biologie des Vektors als auch weitere Erkenntnisse hinsichtlich seines Beitrags zur Übertragung der Malaria neue Ansätze zur Kontrolle dieser Krankheit liefern (Ramirez *et al.*, 2009).

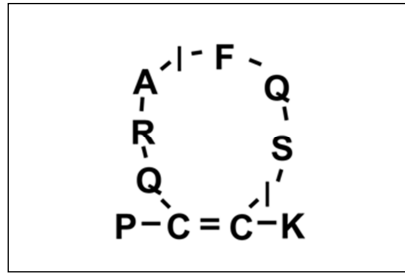
## 1.4 Potentielle Kandidatenproteine und Zielstrukturen zur Inhibition der Entwicklung und Transmission von *Plasmodium*

### 1.4.1 Das *Salivary Gland and Midgut Peptide 1* (SM1)

Die Entwicklung von *Plasmodium* innerhalb des Moskitos ist äußerst komplex (vergleiche Kapitel 1.1.2.1) und der Parasit muss dabei in der Hauptsache zwei verschiedene Epithelgewebe durchdringen: das des Mitteldarms und das der Speicheldrüse (Ghosh *et al.*, 2000; Ghosh *et al.*, 2001). Dabei vermitteln vermutlich spezifische Interaktionen zwischen *Plasmodium* und Rezeptoren auf der Oberfläche der betreffenden Epithelien diesen Durchtritt (Ghosh *et al.*, 2001; Rosenberg, 1985; Shahabuddin & Pimenta, 1998).

Um die Epithelzellen des Mitteldarmgewebes zu penetrieren haften sich die gebildeten motilen Ookineten zunächst an die Oberfläche der Mikrovilli (Ghosh *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2000; Shahabuddin & Pimenta, 1998; Zieler & Dvorak, 2000), wobei die beteiligten Rezeptoren und Liganden noch weitestgehend unbekannt sind. Allerdings konnte gezeigt werden, dass Antikörper gerichtet gegen die Epithelzellen des Mitteldarms teilweise die Invasion der Ookineten verhindern können (Lal *et al.*, 2001). Weiterhin scheinen die Wechselwirkungen zwischen den Sporozoiten mit den Strukturen der Speicheldrüse spezifisch zu sein: i) Die Sporozoiten dringen nur in die distalen - nicht jedoch in die proximalen - Lappen der Speicheldrüse ein (Ghosh *et al.*, 2001; Sterling *et al.*, 1973); ii) Nicht jede *Plasmodium*-Art kann in jeder beliebigen *Anopheles*-Art ihren Lebenszyklus durchlaufen bzw. vollenden. So können Sporozoiten von *P. knowlesi* zwar die Speicheldrüsen von *A. dirus* invadieren, nicht aber die von *A. freeborni* (Ghosh *et al.*, 2001; Rosenberg, 1985); iii) bestimmte Lektine und Antikörper gerichtet gegen Epitope auf der Speicheldrüse können zumindest teilweise die Invasion von Sporozoiten blockieren (Barreau *et al.*, 1999; Barreau *et al.*, 1995; Brennan *et al.*, 2000). Dies führte zu der Annahme, dass *Plasmodium* bestimmte Strukturen auf der Oberfläche der Epithelien von Mitteldarm und Speicheldrüse von *Anopheles* erkennt und mit diesen mit dem Ziel der Invasion der Zellen interagiert (Ghosh *et al.*, 2001).

Mithilfe einer Phagenbibliothek identifizierten Ghosh *et al.* im Jahre 2001 auf der Suche nach Liganden für *Plasmodium* an Mitteldarm und Speicheldrüse von *Anopheles stephensi* ein synthetisches Dodecapeptid (PCQRAIFQSICN; Abb. 1.3), das mit hoher Affinität sowohl an die luminalen Seite des Mitteldarmepithels als auch an die distalen Speicheldrüsenlappen bindet (Ghosh *et al.*, 2001).



**Abbildung 1.3. Struktur und Aminosäuresequenz des *salivary gland and midgut peptide 1* (SM1).** SM1 ist ein Dodecapeptid mit zwei Cystein-Resten an Position 2 und 11, wobei durch die Ausbildung einer Disulfidbrücke ein cyclisches Molekül mit einer Schleife aus acht Aminosäuren entsteht. Abbildung nach Ghosh *et al.*, 2009.

Ghosh *et al.* konnten darüber hinaus zeigen, dass das als *salivary gland and midgut peptide 1* (SM1) bezeichnete Peptid nicht nur die Invasion der Zellen des Mitteldarms durch die Ookineten und damit die Entwicklung von Oocysten, sondern auch das Eindringen der Sporozoiten von *P. berghei* (und *P. falciparum*, unpublizierte Ergebnisse; Ghosh *et al.*, 2009) in die Speicheldrüse effizient inhibierte. Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass das SM1-Peptid die Entwicklung des Parasiten innerhalb des Moskitos durch die Bindung an für die Invasion von *Plasmodium* essentielle Strukturen der beiden Gewebe blockiert (Ghosh *et al.*, 2001).

In weiterführenden Experimenten konnten Ito *et al.* transgene Moskitos erzeugen, die das SM1-Peptid unter der Kontrolle des *A. gambiae* Carboxypeptidase (CP)-Promotors, der durch eine Blutmahlzeit aktiviert wird, exprimierten und in das Mitteldarm-Lumen sezernierten (Ito *et al.*, 2002). Die mit infektiösem Blut (*P. berghei*) gefütterten transgenen *A. stephensi* wiesen eine Inhibition der Oocysten-Bildung von durchschnittlich 81.6 % sowie eine deutlich reduzierte Anzahl an Sporozoiten auf. Dadurch konnte die Transmissionsrate signifikant gesenkt werden (Ito *et al.*, 2002).

Dass das SM1-Peptid sowohl an das Mitteldarmepithel als auch an die distalen Speicheldrüsenlappen bindet, kann darüber hinaus als Hinweis darauf gewertet werden, dass in diesen beiden unterschiedlichen Geweben ähnliche Rezeptoren vorhanden sind (James, 2003).

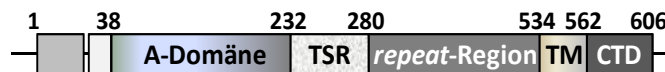
#### 1.4.2 Das *Plasmodium* Thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) und *Anopheles* Saglin

Es wird angenommen, dass die Invasion der Speicheldrüse durch die Sporozoiten durch Rezeptor-Ligand-ähnliche Wechselwirkungen vermittelt wird, die aus der Bindung von parasitären Liganden an spezifische Rezeptoren der Speicheldrüse resultieren (Beerntsen *et al.*, 2000; James, 2003). Dabei sind vermutlich die drei am besten untersuchten Oberflächenproteine der Sporozoiten beteiligt: i) das Sporozoiten-Hüllprotein (*circumsporozoite protein*, CSP); ii) das *Thrombospondin-related anonymous protein* (TRAP), und iii) das *Membrane apical erythrocyte binding-like* (MAEBL) *protein* (Garcia *et al.*, 2006).

Das *thrombospondin-related anonymous protein* (TRAP; Abb. 1.4) wird von den Sporozoiten exprimiert und ist in allen *Plasmodium*-Arten konserviert (Robson *et al.*, 1988). Es ist dabei

essentiell für die Gleitbewegung der Sporozoiten, für die Zellinvasion sowie die Infektiosität *in vivo*. Sultan *et al.* konnten zeigen, dass TRAP-defiziente *P. berghei*-Sporozoiten unbeweglich und unfähig waren, die Speicheldrüse zu invadieren (Sultan *et al.*, 2001; Sultan *et al.*, 1997).

Weitere Mitglieder der TRAP-Proteinfamilie sind beispielsweise das *circumsporozoite- and TRAP-related protein* (CTRAP) von *Plasmodium*, das in den Ookineten exprimiert wird (Dessens *et al.*, 1999; Templeton *et al.*, 2000; Trottein *et al.*, 1995), sowie das *micronemal protein* (MIC) 2 von *Toxoplasma gondii* (Wan *et al.*, 1997). Alle Mitglieder dieser *Apicomplexa*-Proteinfamilie sind Typ-I-Transmembranproteine, wobei der extrazelluläre Teil zwei konservierte adhäsive Domänen besitzt: die von Willebrand Faktor A-Domäne (auch kurz als „A-Domäne“ bezeichnet; Girma *et al.*, 1987; Whittaker & Hynes, 2002) und den *thrombospondin type I repeat* (TSR; Lawler & Hynes, 1986; Tucker, 2004). Mitglieder dieser Proteinfamilie sind außerdem durch eine kurze cytoplasmatische Domäne gekennzeichnet, die die Fortbewegungsfähigkeit vermittelt (Kappe *et al.*, 1999). Mutationen in der cytoplasmatischen Domäne führten zu unbeweglichen nicht-invasiven Sporozoiten. Überraschenderweise kann jedoch die cytoplasmatische Domäne des TRAP gegen die cytoplasmatische Domäne des MIC2 von *Toxoplasma gondii* ausgetauscht werden. Obwohl beide cytoplasmatischen Domänen nur geringe Ähnlichkeit besitzen, behalten die derart veränderten Sporozoiten ihre Beweglichkeit und Fähigkeit zur Zellinvasion (Kappe *et al.*, 1999).



**Abbildung 1.4. Schematische Darstellung des *Plasmodium berghei* TRAP.** Auf die von Willebrand A-Domäne folgt der TSR (*thrombospondin type I repeat*). Der extrazelluläre Teil mit diesen beiden konservierten adhäsiven Domänen wird durch die *repeat*-Region (Tri-Peptid-Wiederholungen) von der Transmembrandomäne (TM) und einer kurzen cytoplasmatischen Region (CTD) getrennt. Verändert nach Ghosh *et al.*, 2009.

Die A-Domäne besitzt ein konserviertes Motiv, das als *metal ion-dependent adhesion site* (MIDAS) bezeichnet wird. Dieses vermittelt die Liganden-Bindung und ist damit essentiell für die Invasion der Sporozoiten in die Speicheldrüse (Lee *et al.*, 1995; Michishita *et al.*, 1993). Es konnte gezeigt werden, dass Sporozoiten mit einer mutierten TRAP-A-Domäne in ihrer Fähigkeit der Speicheldrüseninvasion beeinträchtigt sind, nicht jedoch in ihrer Beweglichkeit. Dies deutet darauf hin, dass die A-Domäne an der Erkennung bzw. Bindung von Rezeptormolekülen der Speicheldrüse beteiligt ist (Wengelnik *et al.*, 1999; Matuschewski *et al.*, 2002).

Das MIDAS-Motiv enthält fünf invariable Aminosäurereste, ein bei allen *Plasmodium*-Arten konserviertes Threonin (T<sub>126</sub>) und Aspartat (D<sub>157</sub>), durch die ein divalentes Magnesium- oder Mangan-Ion koordiniert wird. Werden diese Aminosäurereste gegen Alanin ausgetauscht, so wird die Bindung der A-Domäne an ihren Liganden unterbunden, wobei aber die Faltung der A-

Domäne nicht beeinträchtigt wird (Jethwaney *et al.*, 2005). Eine schematische Darstellung des *Plasmodium berghei* TRAP liefert Abbildung 1.4.

Obwohl schon längere Zeit verschiedene Moleküle (Lektine, Antikörper und Peptide wie das SM1-Peptid (Ghosh *et al.*, 2001)) bekannt sind, die die Invasion der Speicheldrüse blockieren können, sind die molekularen Strukturen, mit denen diese Moleküle interagieren, noch weitgehend unbekannt (James, 2003).

Dabei könnte das Wissen um die für die Speicheldrüseninvasion nötigen Rezeptoren und deren gezielte Blockade einen wichtigen Teil dazu beitragen, die Transmission des Parasiten vom Mosquito auf den Menschen zu blockieren (Brennan *et al.*, 2000). Brennan *et al.* generierten im Jahr 2000 einen monoklonalen Antikörper gerichtet gegen ein 100 kDa großes Speicheldrüsen-Protein von *Anopheles gambiae*, der die Invasion der Sporozoiten von *P. yoelii* in die Speicheldrüse effektiv inhibierte (Reduktion der Sporozoitenzahl pro infizierter Speicheldrüse um etwa 73 %; Brennan *et al.*, 2000). Einige Zeit später konnten Okulate *et al.* zeigen, dass dieser monoklonale Antikörper ein glycosyliertes homodimeres Protein erkennt, das aus zwei Untereinheiten von 50 kDa Größe besteht (Okulate *et al.*, 2007). Die beiden Untereinheiten werden durch Disulfidbrücken verbunden, wobei das als Saglin benannte Protein (*GenBank accession number* AW31598) 412 Aminosäuren umfasst und eine Signalsequenz aus 19 Aminosäuren am N-Terminus besitzt. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei Saglin um ein sezerniertes Protein der Speicheldrüsen handelt. Tatsächlich konnte Saglin auch in der Speichelflüssigkeit von *A. gambiae* gefunden werden, wobei der Mechanismus der Beteiligung von Saglin an der Interaktion zwischen Sporozoiten und Speicheldrüse nicht abschließend geklärt werden konnte (Okulate *et al.*, 2007).

In nachfolgenden Experimenten konnten Ghosh *et al.* einen Zusammenhang zwischen dem synthetischen Dodecapeptid SM1 (Kap. 1.4.1) und dem *thrombospondin-related anonymous protein* (TRAP) als Liganden sowie dem Speicheldrüsenprotein Saglin als Rezeptor im Invasionsprozess aufdecken (Ghosh *et al.*, 2009). Auf der Suche nach einem dem SM1-Peptid ähnlichen, natürlich vorkommenden parasitären Protein konnte unter Verwendung eines anti-SM1-Antikörpers gezeigt werden, dass es sich bei dem SM1-Peptid um ein konformationelles Mimotop der *Plasmodium* TRAP-A-Domäne handelt (Ghosh *et al.*, 2009).

Darüber hinaus konnte das Speicheldrüsenprotein Saglin als der Rezeptor sowohl für das SM1-Peptid als auch für die A-Domäne des TRAP identifiziert werden. Um die Interaktion zwischen Saglin und TRAP zu belegen, wurde in einer Reihe von Untersuchungen die Saglin-Expression herunterreguliert bzw. ganz ausgeschaltet. Dies führte zu einer starken Inhibierung der Speicheldrüseninvasion durch die Sporozoiten (Ghosh *et al.*, 2009).

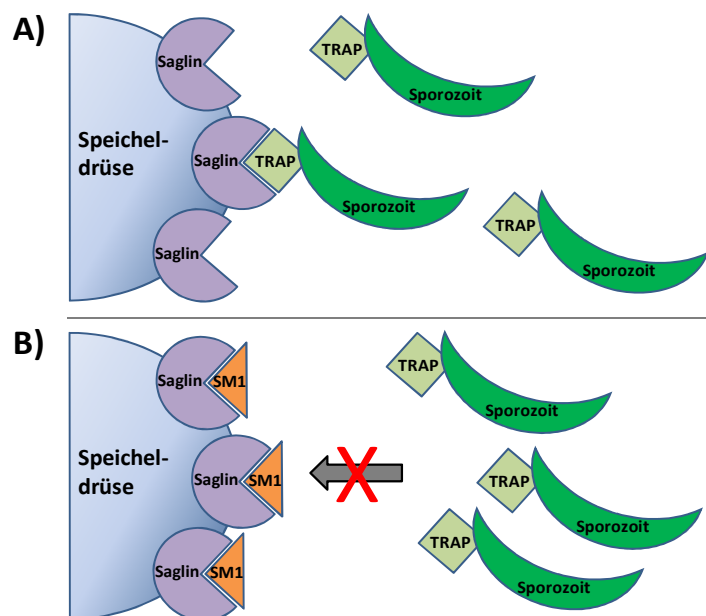
Dabei konnte auch gezeigt werden, dass die A-Domäne des TRAP mit dem SM1-Peptid konzentrationsabhängig um die Bindung an Saglin konkurriert (Ghosh *et al.*, 2009). Obwohl man zwar in der Sequenz des Saglin keine Transmembrandomäne oder eine einem Glycosylphosphatidylinositol-Anker (*GPI anchor*) ähnliche Struktur zur Membranverankerung identifizieren konnte, so sind doch auch Oberflächenproteine beschrieben, die keine

Transmembrandomänen besitzen (Bergmann *et al.*, 2001; Ghosh *et al.*, 2009; Loughnan *et al.*, 1988).

Weiterhin ergaben Untersuchungen mit einem anti-Saglin-Antikörper eine starke Inhibition der Speicheldrüseninvasion durch Sporozoiten von *P. falciparum*. Ähnliche Ergebnisse wurden mit Sporozoiten von *P. berghei* erzielt, was darauf hindeutet, dass sowohl *P. falciparum* als auch *P. berghei* Saglin als einen Rezeptor für die Invasion der Speicheldrüse nutzen (Ghosh *et al.*, 2009). Der gleiche Antikörper hatte in früheren Arbeiten das Eindringen von Sporozoiten von *P. yoelii* in die Speicheldrüse von *Anopheles gambiae* inhibiert (Brennan *et al.*, 2000).

Obwohl die Invasion der Speicheldrüse durch die Sporozoiten einen komplexen Prozeß darstellt (Pimenta *et al.*, 1994), so legen die Ergebnisse, dass i) monoklonale Antikörper gegen Saglin und ii) eine Herunterregulierung der Saglin-Expression *in vivo* zu einer starken Inhibierung der Speicheldrüseninvasion durch Sporozoiten führten, doch die Vermutung nahe, dass einerseits Saglin selbst, andererseits die Wechselwirkung zwischen Saglin und TRAP entscheidend für die Invasion der Speicheldrüse und damit für die Übertragung der Malaria sind (Ghosh *et al.*, 2009).

Abbildung 1.5 veranschaulicht noch einmal die Interaktion von Saglin mit TRAP und dem SM1-Peptid.



**Abbildung 1.5. Schematische Darstellung der Interaktion von Saglin, TRAP und SM1.** A) Die Invasion der Speicheldrüse erfordert die Interaktion zwischen dem Speicheldrüsen-Oberflächenprotein Saglin und dem *Plasmodium*-Sporozoiten-Protein TRAP. B) Das SM1-Peptid bindet an Saglin, wobei es die Konformation des TRAP initiiert und so mit TRAP um die Bindung an Saglin konkurriert. So kann die Invasion der Sporozoiten verhindert werden. Verändert nach Ghosh *et al.*, 2009.

### 1.4.3 Pfs25 und Pfs28: Proteine der Ookineten-Oberfläche von *Plasmodium falciparum*

Wenn *Anopheles* bei einer Blutmahlzeit Gametozyten von *Plasmodium* aufnimmt, bilden sich daraus im Darm der Mücke Gameten, die sich zu Zygoten vereinigen. Diese differenzieren innerhalb des Mitteldarms zu motilen Ookineten (Kap. 1.2.2). Die Entwicklung von *Plasmodium* während der Gametozytogenese und Gametogenese, die mit der Expression sexualstadienspezifischer Proteine einhergeht, ist ein entscheidender Schritt zur Vollendung des parasitären Lebenszyklus und anschließenden Übertragung (Pradel, 2007). Daher sind die sexualstadienspezifischen Proteine als potentielle Kandidaten für die Entwicklung transmissionsblockierender Vakzine (TBV) von hohem wissenschaftlichem Interesse (Pradel, 2007). Eine gezielte Inhibierung dieser Proteine durch spezifische Antikörper könnte die Entwicklung von *Plasmodium* in der Stechmücke unterbrechen und eine Übertragung auf den Menschen verhindern (Kap. 1.3.3.1).

Zwei dieser transmissionsblockierenden Kandidatenproteine sind P25 und P28, die die Plasmamembran von Ookineten dominieren und innerhalb der Gattung *Plasmodium* hochkonserviert sind (Duffy & Kaslow, 1997; Duffy *et al.*, 1993; Kaslow *et al.*, 1988; Kaslow *et al.*, 1989; Kumar & Carter, 1985; Paton *et al.*, 1993; Tsuboi *et al.*, 1997a; Tsuboi *et al.*, 1997b; Tsuboi *et al.*, 1998; Vermeulen *et al.*, 1985). P25 wird in niedrigem Ausmaß auf der Oberfläche von Gametozyten und Gameten, in hohem Maße nach der Fertilisation auf Zygoten sowie Ookineten exprimiert (Fries *et al.*, 1990; Scholz *et al.*, 2008; Vermeulen *et al.*, 1985; Vermeulen *et al.*, 1986). P28 wird wenig später in der Entwicklung als P25 auf Zygoten und Ookineten exprimiert (Duffy & Kaslow, 1997).

P25 und P28 besitzen eine Signalsequenz am N-Terminus, auf die vier EGF-ähnliche Domänen (*epidermal growth factor-like domains*) folgen sowie ein C-terminaler GPI-Anker (*glycosylphosphatidylinositol anchor*), der die Proteine mit der parasitären Plasmamembran verbindet (Blanco *et al.*, 1999; Kaslow, 1997; Kaslow *et al.*, 1988). Sequenzanalysen ergaben, dass P25 22, P28 20 Cysteinreste enthält, die durch Disulfidbrücken verbunden sind.

*Plasmodium* P25 und P28 spielen eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Bindung des Mitteldarmepithels (Siden-Kiamos & Louis, 2004; Siden-Kiamos *et al.*, 2000). Gen-*Knockout*-Experimente ergaben, dass diese Proteine für den Parasiten essentiell sind, um im Mitteldarm von *Anopheles* zu überleben, das Mitteldarmepithel zu penetrieren und zu Oocysten zu reifen. So konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung des Parasiten unterbrochen wurde, wenn beide Proteine fehlten (Tomas *et al.*, 2001) und dass die Invasion von Ookineten in die Epithelzellen des Mitteldarms in hohem Maße reduziert wurde (Baton & Ranford-Cartwright, 2005). Zudem lagerten sich die Ookineten von P25- und P28-defizienten Parasiten nicht aneinander, so wie für Wildtyp-Parasiten üblich (Siden-Kiamos *et al.*, 2000; Sieber *et al.*, 1991; Tomas *et al.*, 2001). Geht man davon aus, dass sich in einer Anhäufung von vielen Ookineten gerade die im Inneren gelegenen Parasiten vor einer Zerstörung durch die proteolytischen Bedingungen des Mitteldarms schützen können, dürfte eine reduzierte Aneinanderlagerung bewirken, dass sämtliche Parasiten einer schädlichen Proteolyse ausgesetzt sind (Gass & Yeates, 1979).

Da sich EGF-ähnliche Domänen vor allem in extrazellulären Proteinen von Eukaryoten finden, wo sie an Adhäsionsprozessen und der Signalwirkung beteiligt sind, wird außerdem angenommen, dass P25 und P28 eine wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen Wirt und Parasit spielen (Appella *et al.*, 1988). Für P25 und P28 von *P. berghei* konnte gezeigt werden, dass sie mit Laminin, einem Hauptbestandteil der Basallamina des Mitteldarms von *Anopheles*, interagieren und dass die Bindung an der Transformation von Ookineten in Oocysten beteiligt ist (Arrighi & Hurd, 2002; Vlachou *et al.*, 2001).

P25 und P28 sind gleichmäßig über die gesamte Oberfläche der Ookineten verteilt (Duffy *et al.*, 1993; Sinden *et al.*, 1987; Winger *et al.*, 1988) und die Ziele spezifischer transmissionsblockierender Antikörper, die die Entwicklung von Oocysten im Darm der Stechmücke verhindern. Obwohl sich die beiden Proteine durch mehrere Cystein-Reste und eine komplexe Tertiärstruktur auszeichnen, wodurch die Produktion in heterologen Expressionssystemen erschwert wird, konnten mit verschiedenen P25- und P28-Varianten einige Erfolge verzeichnet werden.

So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Antiserum von Mäusen, die mit rekombinantem P25 von *P. vivax* (Pvs25) immunisiert worden waren, bei Moskitos, denen gleichzeitig mit *P. vivax* infiziertes Blut und das Antiserum verabreicht worden war, vollständig der Bildung von Oocysten vorbeugte (Hisaeda *et al.*, 2000). Die Immunisierung von Mäusen, Kaninchen und Affen mit in *Saccharomyces cerevisiae* produziertem rekombinantem P25 von *P. falciparum* (Pfs25) lieferte unter Verwendung von Aluminiumhydroxid als Adjuvans transmissionsblockierende Antikörper (Barr *et al.*, 1991; Kaslow *et al.*, 1994; Rawlings & Kaslow, 1992).

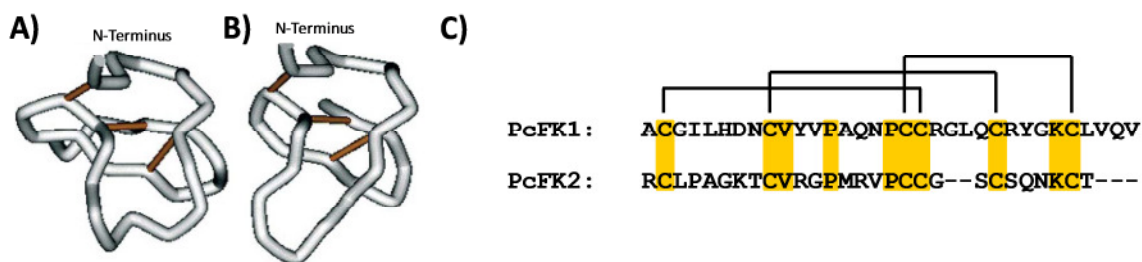
In einer klinischen Studie der Phase I von Pvs25, das an Aluminiumhydroxid adsorbiert vorlag, korrelierten zwar die erzeugten Antikörperspiegel mit einer transmissionsblockierenden Aktivität (Malkin *et al.*, 2005). Allerdings sind die Antikörpertiter nach der Immunisierung sowohl mit Pvs25 als auch mit Pfs25 relativ niedrig und daher für eine starke und langanhaltende Immunantwort Formulierungen mit potenten und zugleich gut verträglichen Adjuvantien vonnöten. Darüber hinaus kann durch die kovalente Konjugation von rekombinantem P25 an andere Proteine die Antikörperbildung verstärkt werden (Kubler-Kielb *et al.*, 2007; Qian *et al.*, 2007; Saxena *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2006). Wurde Pfs25 beispielsweise an *Pseudomonas aeruginosa* Exoprotein A (EPA) gebunden (Pfs25-EPA/Alhydrogel; Qian *et al.*, 2007) oder wurden mehrere Moleküle zu Multimeren verbunden (Kubler-Kielb *et al.*, 2010; Kubler-Kielb *et al.*, 2007), so konnte die Immunogenität des Pfs25 signifikant erhöht werden. Eine klinische Studie der Phase I von Pfs25-EPA/Alhydrogel ist Ende 2011 angelaufen (*Initial Study of Malaria Vaccine Pfs25-EPA/Alhydrogel*; [2]; Schwartz *et al.*, 2012).

#### **1.4.4 PcFK1 und PcFK2: Mikroproteine mit inhibitorischer Wirksamkeit auf *Plasmodium***

Spinnen-Toxine sind wie andere tierische Toxine eine wertvolle Quelle für neue Pharmazeutika, die zudem Vorbild für neuartige antiparasitäre Wirkstoffe sein können. So isolierten Choi *et al.* auf der Suche nach neuen Malaria-Therapeutika im Jahre 2004 zwei Peptide aus dem Gift der

Vogelspinne *Psalmopoeus cambridgei*, die *in vitro* eine starke antiplasmodiale Aktivität gegen die intra-erythrozytären Stadien von *Plasmodium falciparum* aufwiesen ( $IC_{50}$   $1.59 \pm 1.15 \mu M$  bzw.  $1.15 \pm 0.95 \mu M$ ; Choi *et al.*, 2004).

Psalmopeotoxin I und –II (PcFK1 und PcFK2, *Psalmopoeus cambridgei Falciparum killer*) bestehen aus 33 bzw. 28 Aminosäuren und besitzen beide 6 Cysteinreste, die durch drei Disulfidbrücken verknüpft sind und einen sogenannten Cystin-Knoten bilden (Abb. 1.6; Choi *et al.*, 2004). Aufgrund dieser strukturellen Besonderheit und ihres speziellen Disulfidverknüpfungsmotivs gehören sie einer Protein-Familie an, die man als *Inhibitor Cystine Knot-Familie* (ICK) bezeichnet (vergleiche Kap. 1.4.4.1; Choi *et al.*, 2004). PcFK1 zeigt zudem Ähnlichkeit mit anderen, gut charakterisierten Spinnen-Toxinen, die ebenfalls der ICK-Proteinfamilie angehören, und besitzt strukturelle Bereiche, wie sie für verschiedene Neurotoxine bekannt sind, die an Ionenkanälen wirken (Pimentel *et al.*, 2006). Wie elektrophysiologische Untersuchungen ergaben, findet durch PcFK1 oder PcFK2 jedoch keine Inhibition spannungsabhängiger Ionenkanäle und neuromuskulärer Funktionen statt (Choi *et al.*, 2004).



**Abbildung 1.6. Dreidimensionale Struktur von PcFK1 (A) und PcFK2 (B) sowie der Vergleich der Aminosäuresequenzen der beiden Peptide (C).** Konservierte Bereiche sind gelb hervorgehoben, die Disulfidbrücken sind als Linien dargestellt. Verändert nach Choi *et al.*, 2004.

Obwohl teilweise strukturelle Ähnlichkeiten mit antimikrobiellen Peptiden anderer Tierarten bestehen, besitzen PcFK1 und PcFK2 weder eine Wirkung auf das Wachstum der Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida albicans*, noch eine antibakterielle Wirksamkeit (Choi *et al.*, 2004). Darüber hinaus besitzen sie keine cytotoxische Aktivität auf kernhaltige Säugerzellen (Choi *et al.*, 2004).

PcFK1 und PcFK2 binden beide an durch *Plasmodium* infizierte Erythrozyten. Dabei werden die Zellen jedoch, anders als bei dem am besten charakterisierten antiplasmodialen Peptid Dermaseptin S4 aus der Haut eines Frosches der Gattung *Phyllomedusa* (Ghosh *et al.*, 1997), nicht deformiert (Choi *et al.*, 2004). Während PcFK2 selektiv nur mit infizierten Erythrozyten interagiert, bindet PcFK1 auch an gesunde Erythrozyten (Choi *et al.*, 2004). Da PcFK1 hydrophober als PcFK2 ist, könnte die Adsorption von PcFK1 an die Erythrozyten durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der Lipid-Doppelschicht der Erythrozytenmembran bedingt sein (Choi *et al.*, 2004). Weiterhin könnte die Adsorption von PcFK1 an die Erythrozyten auch

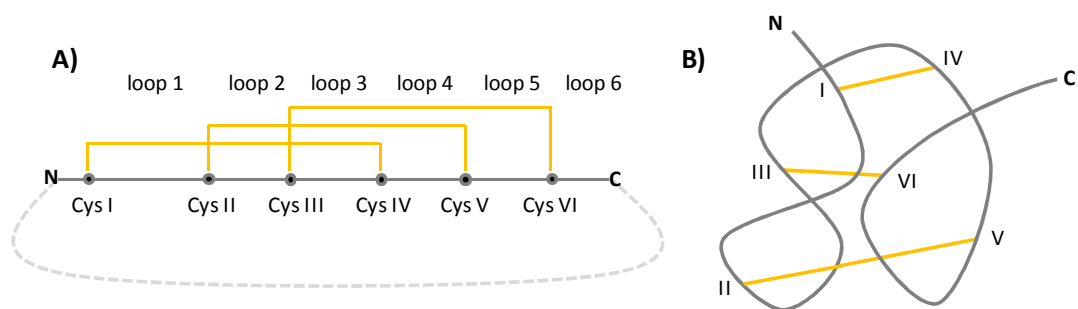


rezeptorvermittelt über die Bindung an einen Ionenkanal stattfinden (Choi *et al.*, 2004; Pimentel *et al.*, 2006), da spezifische Ionenkanäle eine wichtige Rolle bei *Plasmodium*-infizierten Erythrozyten spielen (Staines *et al.*, 2001). PcFK1 und PcFK2 besitzen jedoch keine hämolytische Aktivität, weswegen die Interaktionen mit den Erythrozyten die Permeabilität der Membran und die Funktion der Zellen nicht zu beeinflussen scheinen (Choi *et al.*, 2004). Da PcFK2 selektiv nur an infizierte Erythrozyten bindet, könnten die beiden Peptide entweder an unterschiedlichen Stellen des gleichen Rezeptors oder aber an unterschiedlichen Rezeptoren der Erythrozytenmembran binden. Darüber hinaus könnten jedoch auch parasitäre Antigene auf der Erythrozytenoberfläche oder nach dem Eindringen in die Zelle die Parasitenmembran selbst Angriffspunkte für PcFK1 und PcFK2 sein (Choi *et al.*, 2004).

Obwohl die molekularen Angriffspunkte und Mechanismen, die eine Inhibition des Wachstums von *Plasmodium* bewirken, also noch nicht aufgeklärt sind und auch über die Interaktion der Peptide mit den Erythrozyten nur wenig bekannt ist, sind PcFK1 und PcFK2 aufgrund der oben angeführten Eigenschaften vielversprechende Kandidaten bzw. Vorbilder bei der Entwicklung neuartiger Malaria-Therapeutika.

#### 1.4.4.1 Cystin-Knoten-Mikroproteine (CKM)

Die Superfamilie der Cystin-Knoten-Proteine (*cystine knot proteins*, CKP) zeichnet sich durch ein besonderes Strukturmotiv aus, welches durch die Verknüpfung von sechs konservierten Cystein-Resten gebildet wird. Dabei wird durch die charakteristische Ausbildung von drei Disulfidbrücken ein sogenannter Cystin-Knoten ausgebildet, wobei die Verknüpfung der sechs Cysteine immer in der gleichen Sequenzreihenfolge erfolgt: Cystein I ist mit Cystein IV, Cystein II mit Cystein V und Cystein III mit Cystein VI verknüpft (Abb. 1.7). So führt durch den Ring aus zwei Disulfidbrücken mit deren verbindendem Peptidrückgrat die dritte Disulfidbrückenbindung, wodurch eine mehrsträngige  $\beta$ -Faltblattstruktur entsteht (Craik *et al.*, 2001; Isaacs, 1995; Pallaghy *et al.*, 1994).

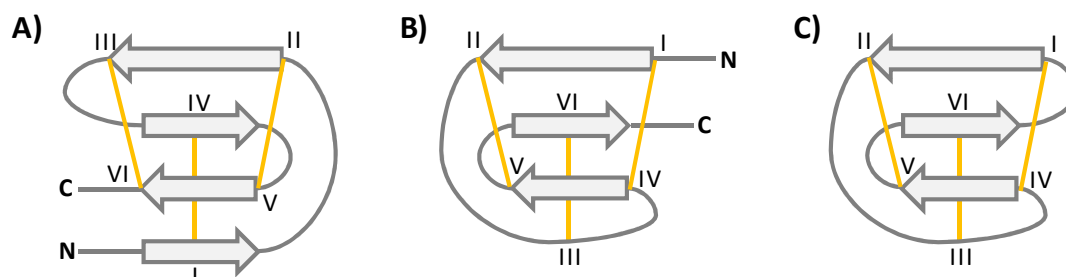


**Abbildung 1.7. Schematische Darstellung der Cystin-Knoten-Proteine.** A) Charakteristische Verknüpfung der konservierten Cystein-Reste in allen bekannten Cystin-Knoten-Proteinen mit den sechs Rückgrat-Schleifen (= *loops*). Eine Cyclisierung des Rückgrats ist bei den cyclischen Vertretern dieser Protein-Familie anzutreffen (gestrichelte Linie). B) Schematische Darstellung der Topologie eines nicht-cyclischen CKP. Die Disulfidbrücken sind gelb hervorgehoben. Abbildung modifiziert nach (Craik *et al.*, 1999).

Die Familie der Cystin-Knoten-Proteine lässt sich topologisch in drei unterschiedliche Gruppen einteilen (Craig *et al.*, 2001; Isaacs, 1995; Pallaghy *et al.*, 1994): i) die Gruppe der Wachstumsfaktor-CKP (McDonald & Hendrickson, 1993; Murray-Rust *et al.*, 1993); ii) die Gruppe der CKP mit ICK-Faltungsmotiv (*inhibitor cystine knot motif*; Pallaghy *et al.*, 1994), die auch als *knottins* oder Knottine bezeichnet werden (Gelly *et al.*, 2004; Le Nguyen *et al.*, 1990), und iii) die Gruppe der CKP mit CCK-Faltungsmotiv (*cyclic cystine knot motif*, Craig *et al.*, 1999). Die Wachstumsfaktor-CKP zeichnen sich durch einen Cystin-Knoten aus, der mit mehreren  $\beta$ -Faltblattsträngen assoziiert ist, wobei die Disulfidbrückenbindung von Cys I – IV den durch die beiden anderen Disulfidbrücken gebildeten Ring durchzieht (Abb. 1.8).

Im Gegensatz zu den Wachstumsfaktor-CKP besitzen die CKP mit ICK- bzw. CCK-Faltungsmotiv ein dreisträngiges antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt. Dabei wird der Cystin-Knoten von der Disulfidbrückenbindung von Cys III – VI durchzogen (Abb. 1.8; Schmoldt, 2005; Craig *et al.*, 2004).

Der bedeutendste Unterschied zwischen ICK- und CCK-Proteinen ist deren cyclisches Grundgerüst, bei dem das N- und C-terminale Ende durch eine zusätzliche Peptidbindung verknüpft sind (Abb. 1.8).



**Abbildung 1.8. Topologie der unterschiedlichen Gruppen der Cystin-Knoten-Proteine.** A) Wachstumsfaktor-CKP. B) ICK-Proteine. C) CCK-Proteine. Die Cystein-Reste sind beginnend vom N-terminalen Ende mit I bis VI nummeriert. Die Cysteinbrückenbindungen sind gelb hervorgehoben und  $\beta$ -Faltblattstränge als Pfeile dargestellt. Verändert nach Schmoldt (2005).

Obwohl Cystin-Knoten-Mikroproteine eine geringe Größe von nur etwa 26 bis 48 Aminosäuren haben, besitzen sie doch viele der Eigenschaften größerer Proteine wie eine definierte Sekundärstruktur und eine geordnete dreidimensionale Faltung. Der Cystin-Knoten bildet ein kompaktes und stabiles Faltungsmotiv und verleiht den Peptiden eine außergewöhnliche chemische, thermische und enzymatische Stabilität. Diese ist bei Vertretern der CCK-Familie durch das cyclische Rückgrat noch höher als bei Mitgliedern der ICK-Proteinfamilie (Colgrave & Craig, 2004) und die Bioaktivität bleibt beispielsweise sogar nach Aufkochen erhalten (Craig *et al.*, 2004).

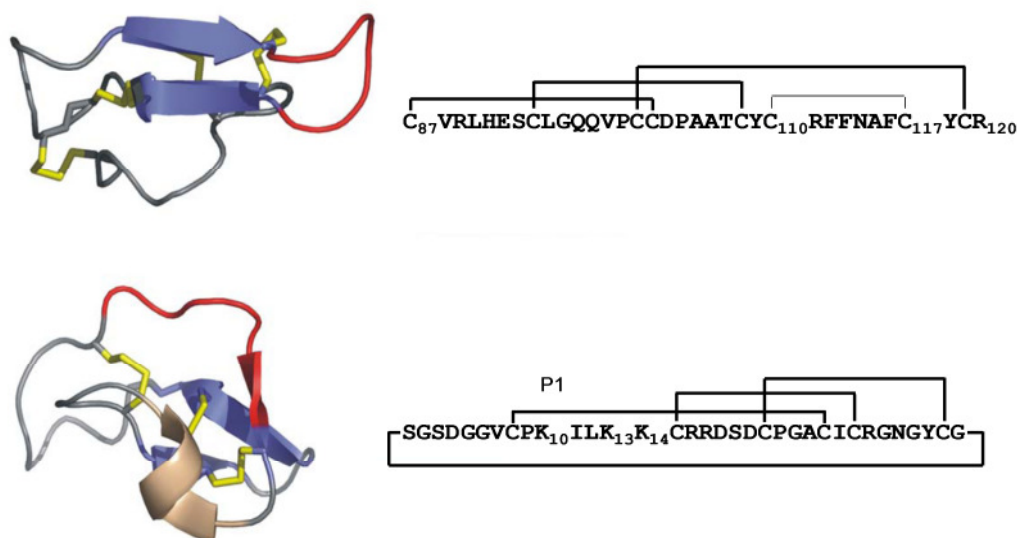
Cystin-Knoten-Proteine sind in den verschiedensten Organismen anzutreffen, darunter Pilze, Krabben, Kegelschnecken, Spinnen, Säugetiere und Pflanzen (Gruber *et al.*, 2007). Tierische CKM wirken durch die Blockade bestimmter Ionenkanäle oft neurotoxisch, wie z. B. die Conotoxine aus Kegelschnecken (Terlau & Olivera, 2004). Auch in humanen Proteinen konnte das Cystin-Knoten-Motiv gefunden werden. So konnte dem humanen endogenen Antagonist der Melanocortinrezeptoren MCR3 und -4, *Agouti-Related Protein* (AGRP), das ICK-Faltungsmotiv zugeordnet werden (Jackson *et al.*, 2002; McNulty *et al.*, 2001; Ollmann *et al.*, 1997). Untersuchungen haben gezeigt, dass sowohl die auf die Cystein-reiche C-terminale Domäne reduzierte AGRP-Variante, entsprechend AGRP<sub>87-132</sub>, als auch die noch weiter, auf die Cystin-Knoten-Domäne minimierte Variante, entsprechend AGRP<sub>87-120</sub>, die gleiche Rezeptoraffinität und antagonistische Wirksamkeit wie das Volllängeprotein aufweisen (Jackson *et al.*, 2002; McNulty *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 1999). Zudem konnte gezeigt werden, dass das Peptidsegment zwischen Cys<sub>110</sub> und Cys<sub>117</sub> die funktionale Schleife darstellt (Abb. 1.9; Bolin *et al.*, 1999). Dies impliziert, dass die molekularen Eigenschaften, die die Affinität des AGRP an den MCR3 und -4 vermitteln, hauptsächlich auf den 34 Aminosäuren, die die ICK-Domäne bilden, beruhen (Jackson *et al.*, 2002).

In den letzten 20 Jahren wurden etliche circuläre Proteine in Bakterien, Tieren und Pflanzen entdeckt (Trahi & Craik, 2002). Heute sind über 160 Vertreter cyclischer Cystin-Knoten-Proteine pflanzlichen Ursprungs bekannt, wobei die Tendenz steigend ist und diese Proteinfamilie wohl tausende Vertreter hat (Craik *et al.*, 2004; Garcia & Camarero, 2010; Gruber *et al.*, 2007; Gould *et al.*, 2011). Diese als Cyclotide bezeichneten pflanzlichen Peptide (Craik *et al.*, 1999) sind die größte Familie circulärer Proteine und wurden hauptsächlich aus Pflanzen der Familien der Rubiaceae und Violaceae isoliert. Zudem sind sie die einzigen ihrer Art, die das Motiv des Cystin-Knotens mit einem cyclischen Peptid-Rückgrat vereinen (Gruber *et al.*, 2007).

Der erste bekannte Vertreter der CCK-Proteinfamilie, Kalata B1 aus den oberirdischen Teilen der afrikanischen Pflanze *Oldenlandia affinis* (Rubiaceae), wurde in den frühen 1970-er Jahren beschrieben. Das Peptid kann in großen Mengen aus der Pflanze isoliert werden und besitzt eine uterotone Wirksamkeit, weshalb es von den Frauen ortsansässiger Stämme in Form von Tees zur Geburtshilfe eingesetzt wurde (Gran, 1973a, b, c). Allerdings vergingen etwa 20 Jahre, bis die Aminosäurestruktur, das cyclische Rückgrat und die dreidimensionale Struktur von Kalata B1 aufgeklärt wurden (Craik *et al.*, 2004; Saether *et al.*, 1995).

Im Jahre 2000 wurden die Aminosäuresequenzen und biologische Aktivität zweier neuer macrocyclischer Peptide einer Pflanze aus der Familie der Cucurbitaceae, *Momordica cochinchinensis*, beschrieben (Craik *et al.*, 2004; Hernandez *et al.*, 2000). Die Peptide MCoTI-I und MCoTI-II (*Momordica cochinchinensis* trypsin inhibitor I und II) sind 34 Aminosäuren lange Trypsin-Inhibitoren, deren Disulfidbrücken-Struktur von den bereits bekannten macrocyclischen CKP abweicht: i) die Cystein-Reste besitzen einen anderen Abstand und ii) sie sind Homologe zu acyclischen Trypsin-Inhibitoren der Familie der Knottine (ICK-Faltungsmotiv; Le Nguyen *et al.*, 1990). Obwohl die Struktur von MCoTI-II ein cyclisches Cystin-Knoten-Motiv (CCK-Faltungsmotiv)

aufweist, kann es daher auch als Mitglied der ICK-Familie klassifiziert werden (Craig *et al.*, 2004; Felizmenio-Quimio *et al.*, 2001; Heitz *et al.*, 2001). Während für verschiedene lineare Peptide die Aufnahme in Zellen bereits zuvor beschrieben wurde, ist MCoTI-II zudem der erste Vertreter macrocyclischer Peptide, für den eine Aufnahme in Zellen beschrieben werden konnte (Greenwood *et al.*, 2007). Das für die Trypsin-Inhibition entscheidende Reaktionszentrum in der P1-Position, den sogenannten P1-Rest, bildet das Lysin in Position 10 ( $K_{10}$ ) in der aktiven Schleife zwischen Cys I und Cys II. Durch den Lysin-Rest in der P1-Position wird das aktive Zentrum des Trypsins inhibiert (Abb. 1.9; Avrutina *et al.*, 2005; Bode & Huber, 1992; Czapinska & Otlewski, 1999).



**Abbildung 1.9. Schematische Darstellung der Cystin-Knoten-Mikroproteine AGRP<sub>87-120</sub> und MCoTI-II.** Oben: Minimiertes Fragment der C-terminalen Domäne des AGRP (AGRP<sub>87-120</sub>; Jackson *et al.*, 2002). Unten: Trypsin-Inhibitor MCoTI-II aus *Momordica cochinchinensis* (Felizmenio-Quimio *et al.*, 2001). Die Disulfidbrückenbindungen sind gelb, die  $\beta$ -Faltblattstränge blau, die  $\alpha$ -Helix braun und die funktionale Schleife rot hervorgehoben. Die Aminosäuresequenzen sowie die Verknüpfung der Disulfidbrücken sind neben den dreidimensionalen Strukturen angegeben. Dickere Linien verdeutlichen das ICK- (AGRP) bzw. das CCK-Faltungsmotiv (MCoTI-II). Weitere Erklärungen im Text. Abbildung verändert nach Schmoldt (2005) und Jackson *et al.*, 2002.

Die Cyclotide besitzen interessante und sehr verschiedene biologische Aktivitäten, wie uterotone, hämolytische, anti-HIV-, Neurotensin-antagonistische, antimikrobielle, trypsininhibitorische, insektizide und cytotoxische Wirksamkeit (Craig *et al.*, 2004), wobei sie darüber hinaus fähig sind, Zellmembranen zu durchqueren (Garcia & Camarero, 2010; Greenwood *et al.*, 2007). Dabei ist ihre natürliche Funktion in der Pflanze wohl die Verteidigung und der Schutz vor äußeren Angriffen (Gruber *et al.*, 2007). Eine der größten Gruppen bilden die Proteinase-Inhibitoren (Chiche *et al.*, 2004) wie beispielsweise MCoTI-I und MCoTI-II (siehe auch oben) sowie der Trypsin Inhibitor EETI-II aus *Ecballium elaterium* (Cucurbitaceae; Heitz *et al.*, 1989; Le-Nguyen *et al.*, 1989).

Ihre besonderen Eigenschaften wie die einzigartige Struktur, außergewöhnliche Stabilität sowie ihre verschiedensten biologischen Aktivitäten und Diversität machen die Cyclotide zu äußerst interessanten Kandidaten für agrochemische und pharmazeutische Anwendungen (Gruber *et al.*, 2007). Durch die Verwendung als molekulare Grundgerüste (*scaffolds*) können durch die Integration/Transplantation funktioneller Peptide zudem gezielte Modifikationen eingebracht und so Moleküle mit neuer Funktion generiert werden. Dabei können entweder ganze Schleifen oder nur bestimmte Bereiche der Schleifen verändert werden (Nygren & Skerra, 2004; Skerra, 2000). Die Mutation des P1-Restes in der aktiven Schleife von MCoTI-II ergab beispielsweise verschiedene Analoga mit unterschiedlicher Wirksamkeit gegen bestimmte Proteasen wie die 3C-Protease des Maul- und Klauenseuche-Virus (Thongyoo *et al.*, 2008).

In dieser Arbeit wurde sowohl eine Variante des AGRP als auch des MCoTI-II als molekulares Grundgerüst verwendet und in die funktionalen Schleifen das SM1-Peptid (vergleiche Kap. 1.4.1) integriert. Abbildung 1.9 zeigt die dreidimensionale Struktur und Aminosäuresequenz von AGRP beziehungsweise MCoTI-II.

## 1.5 Produktion rekombinanter Proteine in Pflanzen

Seit der 1980er Jahre wurden durch die Entwicklung geeigneter Transformationssysteme neben den konventionellen Produktionssystemen wie Bakterien, Hefen sowie Insekten- oder Säugerzellen vermehrt auch Pflanzen als sogenannte Bioreaktoren zur Gewinnung rekombinanter Proteine oder Proteintherapeutika interessant. Dabei können heute die verschiedensten Pflanzenarten und -gewebe zur stabilen oder transienten Transgen-Expression verwendet werden und auch eine gerichtete Anreicherung der rekombinanten Proteine in bestimmten Kompartimenten der Pflanzenzelle ist möglich. Die Liste der in Pflanzen produzierten pharmazeutischen Proteine reicht von Blutprodukten und Wachstumsfaktoren über Hormone und Antikörper bis hin zu Vakzinen, wobei sich einige in klinischen Studien befinden (Rybicki, 2009; Twyman *et al.*, 2003). Die in Karottenzellen (ProCellEx<sup>®</sup>) produzierte Glucocerebrosidase (Taliglucerase alfa) von Protalix Biotherapeutics erhielt unter dem Handelsnamen ELELYSO<sup>™</sup> 2012 in den USA und Israel die Zulassung zur Therapie des adulten Typ 1 von Morbus Gaucher. ELELYSO<sup>™</sup> ist damit das erste von der FDA (U.S. Food and Drug Administration) zugelassene in Pflanzenzellen produzierte rekombinante therapeutische Protein (Protalix Biotherapeutics, 2012; Zimran *et al.*, 2011).

Die Produktion rekombinanter Proteine oder Proteintherapeutika in Pflanzen bietet gegenüber den konventionellen Systemen einige Vorteile. Durch die Möglichkeit posttranskriptionaler und posttranslationaler Modifikationen wie Glycosylierung und die Ausbildung von Disulfidbrückenbindungen können auch komplexe Proteinmoleküle produziert werden. Zudem bieten in Pflanzen produzierte Proteintherapeutika eine erhöhte Sicherheit, da das Risiko der Kontamination mit Human- oder Tierpathogenen sowie mikrobiellen Toxinen minimal ist. Durch

die verhältnismäßig niedrigen Kosten insbesondere hinsichtlich der Kultivierung und durch relativ einfache und schnelle Maßstabsvergrößerung bieten Pflanzen eine kostengünstige Alternative zu den herkömmlichen Produktionsplattformen (Daniell *et al.*, 2001; Kusnadi *et al.*, 1997; Ma *et al.*, 2003). Wird das rekombinante Protein in den Speicherorganen der Pflanzen (Samen, Knollen) akkumuliert, so ermöglicht dies darüber hinaus die Lagerung oder den Transport ohne erforderliche Kühlung und, falls es sich um essbare Pflanzenteile handelt, die direkte orale Applikation (Daniell *et al.*, 2001).

Es soll an dieser Stelle jedoch nicht unerwähnt bleiben, dass die Kommerzialisierung von in Pflanzen produzierten rekombinanten Proteinen und Therapeutika nicht nur durch regulatorische Aspekte und Prozesse bei der Zulassung eingeschränkt wird, sondern auch mit sozialen und ethischen Hindernissen verbunden sein kann.

Die Produktion rekombinanter Proteine und Proteintherapeutika in Pflanzen wurde in den letzten Jahren ausführlich beschrieben und diskutiert (z. B. Daniell *et al.*, 2009; Fischer *et al.*, 2004; Kusnadi *et al.*, 1997; Ma *et al.*, 2003; Streatfield, 2007).

Die Transformation der Pflanzen und Expression der Transgene kann mittels verschiedener Techniken erreicht werden: die stabile Transformation durch den Gentransfer mittels *Agrobacterium tumefaciens* oder durch biolistische Methoden (Beschuss von Pflanzengewebe mit DNA-beschichteten Mikropartikeln) sowie die transiente Transformation unter Verwendung von auf Pflanzenviren basierenden Vektoren (N. N. 1985; Christou, 1995; Maliga, 2003; Staub *et al.*, 2000). Die Wahl der Transformationsmethode ist dabei u. a. abhängig von der verwendeten Pflanzenart, ihrer Regenerierungsfähigkeit in der Zellkultur sowie dem zur Insertion oder Expression bestimmten Zellorganell (Warzecha, 2008).

Auch einige Antigene von *Plasmodium* spp. wurden in Pflanzen exprimiert und auf ihre Immunogenität getestet (Tabelle 1.1; Clemente & Corigliano, 2012). So konnten beispielsweise Davoodi-Semiromi *et al.* das *P. falciparum* apical membrane antigen-1 (PfAMA1) und merozoite surface protein-1 (PMSP1), welche an die B-Untereinheit des Choleratoxins gebunden waren (cholera toxin-B subunit, CTB), in transplastomen Tabak- (*Nicotiana tabacum*) und Salatpflanzen (*Lactuca sativa*) akkumulieren. Dabei wurden in den Salatpflanzen Akkumulationsraten von 7.3 bzw. 6.1 % des löslichen Gesamtproteins (LGP) erreicht, so dass hier auch eine orale Applikation in Erwägung gezogen werden könnte (Davoodi-Semiromi *et al.*, 2010).

Tabelle 1.1: Übersicht der in Pflanzen exprimierten Antigene von *Plasmodium* ssp. Tabelle verändert nach Clemente und Corigliano, 2012.

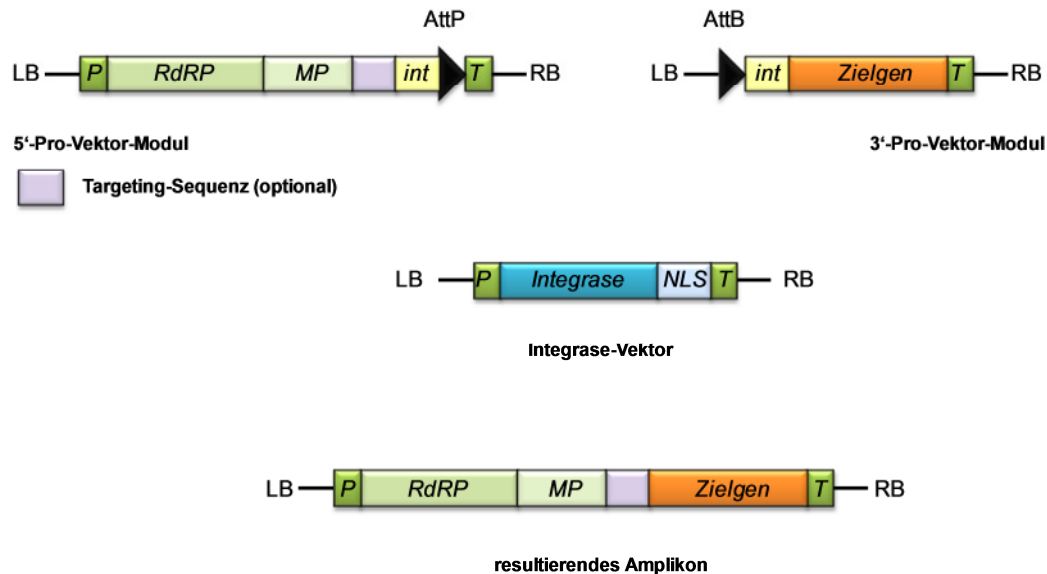
Antigene	Pflanze/Expressionssystem	Referenzen
<b>Antigene der asexuellen Blutstadien</b>		
<i>P. falciparum</i> MSP1 <sub>19</sub> (PfMSP1 <sub>19</sub> )	<i>N. tabacum</i> / Kerntransformation	(Ghosh <i>et al.</i> , 2002)
<i>P. falciparum</i> MSP1 <sub>42</sub> (PfMSP1 <sub>42</sub> )	<i>A. thaliana</i> -Samen/ Kerntransformation	(Lau <i>et al.</i> , 2010)
<i>P. yoelii</i> MSP4/5 (PyMSP4/5)	<i>N. tabacum</i> / Kerntransformation	(Wang <i>et al.</i> , 2008)
	<i>N. benthamiana</i> / transient	(Webster <i>et al.</i> , 2009)
<i>P. yoelii</i> MSP1 <sub>19</sub> (PyMSP1 <sub>19</sub> )	<i>N. benthamiana</i> / transient	(Ma <i>et al.</i> , 2012)
<i>P. falciparum</i> AMA1 (PfAMA1)	<i>N. tabacum</i> / Chloroplastentransformation	(Davoodi-Semiromi <i>et al.</i> , 2010)
	<i>L. sativa</i> / Chloroplastentransformation	
<i>P. falciparum</i> MSP1 (PfMSP1)	<i>N. tabacum</i> / Chloroplastentransformation	(Davoodi-Semiromi <i>et al.</i> , 2010)
	<i>L. sativa</i> / Chloroplastentransformation	
<i>P. vivax</i> MSP1 (PvMSP1)	<i>B. napus</i> / Kerntransformation	(Lee <i>et al.</i> , 2011)
<i>P. vivax</i> CSP (PvCSP)	<i>B. napus</i> / Kerntransformation	(Lee <i>et al.</i> , 2011)
<b>Antigene der Sexualstadien</b>		
<i>P. falciparum</i> P230 (Pfs230)	<i>N. benthamiana</i> / Agroinfiltration	(Farrance <i>et al.</i> , 2011b)
<i>P. falciparum</i> P25 (Pfs25)	<i>N. benthamiana</i> / Agroinfiltration	(Farrance <i>et al.</i> , 2011a)

### 1.5.1 Transiente Expression in *Nicotiana benthamiana*

Neben der stabilen genetischen Transformation des Zellkerns oder des Chloroplastengenoms der Pflanze stellt die transiente Expression von Transgenen unter Verwendung viraler Vektoren eine Alternative zu den stabilen Transformationsmethoden dar. Transiente Expressionssysteme beruhen dabei auf Vektoren, die sich von Pflanzenviren, besonders dem Tabakmosaikvirus (TMV) oder Kartoffel-X-Virus, ableiten und zumeist via *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer in den Zellkern der Pflanze eingeschleust werden (Marillonnet *et al.*, 2005). Obwohl transiente Expressionssysteme den Vorteil einer schnellen Verfügbarkeit der rekombinanten Proteine bieten, spielten sie lange Zeit aufgrund vorhandener Schwächen wie der niedrigen Akkumulationsrate eine eher untergeordnete Rolle für die Expression von therapeutischen Proteinen.

Die Firma *ICON Genetics* publizierte im Jahr 2004 ein transientes virales Expressionssystem, mit dem es gelungen ist, Proteinakkumulationsraten von bis zu 80 % des löslichen Gesamtproteins (LGP) zu erzielen (Marillonnet *et al.*, 2004; Marillonnet *et al.*, 2005). Das magnICON® -System

von *ICON Genetics* basiert auf der *in planta*-Assemblierung funktionaler viraler Vektoren aus einzelnen Provektor-Modulen. Statt des gesamten Vektors werden hier verschiedene einzelne Module des viralen Vektors und des Transgens in die Pflanzenzelle eingebracht, wo sie mit Hilfe einer spezifischen Rekombinase zu einem transkribierbaren Amplikon zusammengefügt werden (Abb. 1.10).

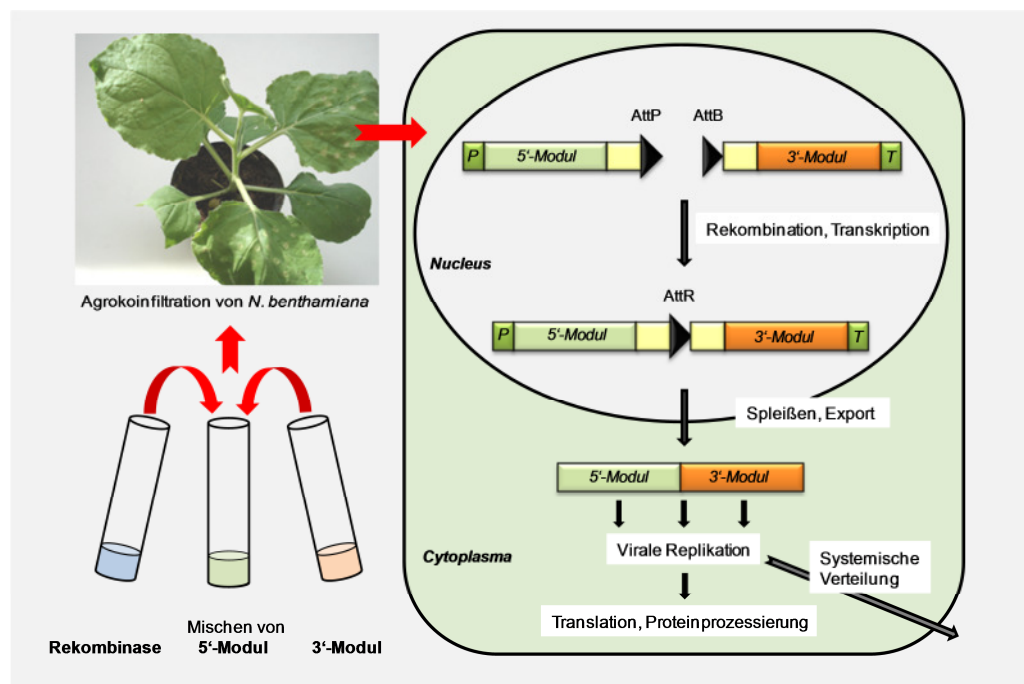


**Abbildung 1.10. Schematische Darstellung der Vektoren des transienten viralen Expressionssystems von *ICON Genetics*.** Dargestellt sind 5'- und 3'-Pro-Vektor-Modul sowie das Rekombinationsmodul und das nach Rekombination und Spleißen entstehende Amplikon. LB: Left Border; RB: Right Border; P: *A. t. ACT2*-Promotor; RdRP: Sequenz kodierend für eine RNA-abhängige RNA-Polymerase; MP: Sequenz kodierend für das Movement-Protein; int: Intronsequenz; *AttP* und *AttB*: Integrase-Rekombinationsstellen des Bakteriophagen *phi* C31 von *Streptomyces*; T: Terminator der Nopalinsynthase *Tnos*; NLS: Sequenz kodierend für ein Signalpeptid zur Kernlokation (*nuclear localisation sequence*); Abbildung modifiziert nach Marillonnet *et al.*, 2004 und Glenz (2005).

Die Transfektion der Pflanzenzellen erfolgt hierbei über die Koinfiltration von Suspensionen von *Agrobacterium*, welches die einzelnen Pro-Vektor-Module sowie das Rekombinationsmodul trägt. Das 5'-Pro-Vektor-Modul besteht dabei aus dem 5'-Teil des viralen Vektors mit kodierenden Bereichen für eine RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP) unter der Kontrolle des Actin 2-Promotors aus *Arabidopsis thaliana* (*ACT2*) und für ein Movement-Protein (MP) zur systemischen Verteilung der entstehenden RNA innerhalb der Pflanze. Flankiert wird dieses von einer Intronsequenz und der Integrase-Rekombinationsstelle *AttP* des Bakteriophagen *phi* ( $\Phi$ ) C31 von *Streptomyces* sowie vom Terminator der Nopalinsynthase *Tnos*. Das 3'-Pro-Vektor-Modul enthält dagegen neben dem Sequenzabschnitt des viralen Vektors mit der Integrase-Rekombinationssequenz *AttB* und einer Intronsequenz eine multiple Klonierungsstelle (MKS) zur



Insertion des gewünschten zu exprimierenden Gens. Die MKS wird strangabwärts vom Terminator der Nopalinsynthase *Tnos* flankiert. Das Rekombinationsmodul kodiert für die Integrase, die unter der Kontrolle des *ACT2*-Promotors steht und C-terminal mit einer Sequenz fusioniert ist, die für ein Signalpeptid zur Kernlokation kodiert (*nuclear localisation sequence*, NLS). Nach der Translation wird diese daher in den Zellkern der Pflanze zurückgeleitet und erkennt dort die Rekombinationssequenzen *AttP* und *AttB* der Pro-Vektor-Module, die so zu einem transkribierbaren Amplikon verknüpft werden. Nach der Rekombination und Transkription werden unerwünschte Elemente wie die Rekombinationsstellen durch Spleißen der Intronsequenzen entfernt und die RNA kann ins Cytosol entlassen und translatiert werden (Abb. 1.11).



**Abbildung 1.11. Schematische Darstellung des modularen transienten Expressionssystems.** Die einzelnen Suspensionen von *Agrobacterium* mit jeweils einem der Module (5′-, 3′- oder Rekombinationsmodul) werden zu gleichen Teilen gemischt und mit einer Spritze in die Stomata der Blattunterseite von *N. benthamiana* infiltriert. Die Module werden im Zellkern durch die Aktivität der Rekombinase zu einem transkribierbaren Amplikon verbunden. Nach Transkription und Spleißen wird die RNA ins Cytosol entlassen und translatiert. Durch Coexpression viraler Movement-Proteine kann eine systemische Verteilung der RNA innerhalb der Pflanze stattfinden. Je nach eingesetztem 5′-Modul verbleibt das entstandene Proprotein entweder im Cytosol oder wird entsprechend seiner Signalsequenz in ein bestimmtes Zellkompartiment transportiert. Abbildung modifiziert nach Marillonnet *et al.*, 2004 und Glenz (2005).

Mit dem magnICON® -System ist es zudem möglich, mittels modifizierter 5′-Pro-Vektor-Module das Zielprotein in verschiedenen Zellkompartimenten der Pflanze wie dem Chloroplast oder Endoplasmatischem Retikulum (Apoplast) zu exprimieren. Dazu besitzen die 5′-Module strangabwärts der MP-Sequenz die entsprechenden Targeting-Sequenzen, die für die

Signalpeptide zum Transport des Proteins in das jeweilige Zellkompartiment kodieren. Damit ist es möglich, den Einfluss der Lokalisation des Zielproteins auf die Akkumulationsrate, die Faltung oder auf posttranslationale Modifikationen zu untersuchen und das System für eine optimale Expression entsprechend auszurichten.

Neben den hohen möglichen Akkumulationsraten von bis zu 80 % des LGP ist ein weiterer großer Vorteil dieses Systems seine Schnelligkeit, da zwischen der Transfektion der Pflanze und der Proteinsynthese nur wenige Tage liegen. So beginnt die Expression des Transgens bereits 3 Tage p. i. und kann bis Tag 14 p. i. detektiert werden (Marillonnet *et al.*, 2004).

Unter Verwendung des magnICON®-Systems konnten auch große Mengen plasmodialer Antigene generiert werden: Webster *et al.* beispielsweise exprimierten eine Kodon-optimierte *P. yoelii* MSP4/5-Variante und beschrieben Akkumulationsraten von bis zu 10 % des LGP (Webster *et al.*, 2009). Untersuchungen zur Immunogenität ergaben, dass die aus *N. benthamiana* gewonnene Variante in der Maus bei oraler Applikation unter Verwendung eines Adjuvans spezifische Antikörper induziert (Webster *et al.*, 2009).

### 1.5.2 Expression rekombinanter Proteine im Phloemsaft und Nektar von *Ricinus communis* L.

In höheren Pflanzen findet der Transport von Photoassimilaten, Pflanzenhormonen und einer Vielzahl weiterer Signalmoleküle im Phloem statt (Gottschalk *et al.*, 2008). Dazu gehören nicht nur kleine C- und N-haltige Moleküle wie Zucker, Zuckeralkohole und Aminosäuren, sondern auch Makromoleküle wie Proteine und RNA (Balachandran *et al.*, 1997; Sjolund, 1997; Stadler *et al.*, 2005). Dabei wird angenommen, dass die entsprechenden Proteine in den Geleitzellen synthetisiert werden und durch die Plasmodesmata in die Siebelemente gelangen (Imlau *et al.*, 1999). Die Anwesenheit von Polypeptiden im Phloemsaft wurde als erstes nach Untersuchungen an Kürbis, Reis, Weizen und *Ricinus* beschrieben (Gottschalk *et al.*, 2008).

*Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae, Abb. 1.12) ist insbesondere wegen seiner ölhaltigen Samen eine bedeutende Kulturpflanze, die vor allem in tropischen und subtropischen Ländern weit verbreitet ist (Weiss, 2000). Die Samen enthalten etwa 50 % fettes Öl und sind die einzige kommerzielle Quelle für das Triglycerid Ricinolsäure (Triricinolein), den Hauptbestandteil des Öles. Rizinusöl wurde in erster Linie als Abführmittel zur kurzfristigen Behandlung der Obstipation sowie als vielfältig einsetzbares Schmiermittel verwendet. Heute sind das Ricinusöl selbst sowie die Ricinolsäure und ihre Derivate wichtige Rohstoffe mit wachsender Verwendung z. B. in der chemischen Industrie oder der Textil-, Papier- und Kosmetikindustrie zur Herstellung verschiedenster industrieller Produkte (Caupin, 1997; Sujatha *et al.*, 2008). Ricinusöl wird daher in großen Mengen gehandelt, wobei Indien, China und Brasilien die größten Erzeuger für den Weltmarkt darstellen (Weiss, 2000).

Allerdings ist die Kultivierung bzw. Verarbeitung der gängigen Varietäten von *Ricinus* mit großen gesundheitlichen Risiken verbunden, da die Samen das Toxin Ricin (Hartley & Lord, 2004; Lord *et al.*, 1994) und hyperallergene Proteine (2S-Albumine) enthalten (Pastorello *et al.*, 2001; Shewry *et al.*, 2002), was die Kultivierung - besonders in den industrialisierten Ländern - stark

limitiert. Zudem wird die Kultivierung von *Ricinus* durch die Anfälligkeit der verfügbaren Kulturvarietäten gegenüber biotischem und abiotischem Stress eingeschränkt. Daher wurden in der Vergangenheit Anstrengungen unternommen, ein effizientes *in vitro*-Regenerationsprotokoll zu etablieren, um robustere und weniger toxische Sorten zu generieren. Der Gehalt an toxischem Protein konnte dabei sowohl durch konventionelle Züchtung als auch durch gentechnische Manipulation des *Ricinus* reduziert werden (Auld *et al.*, 2001).

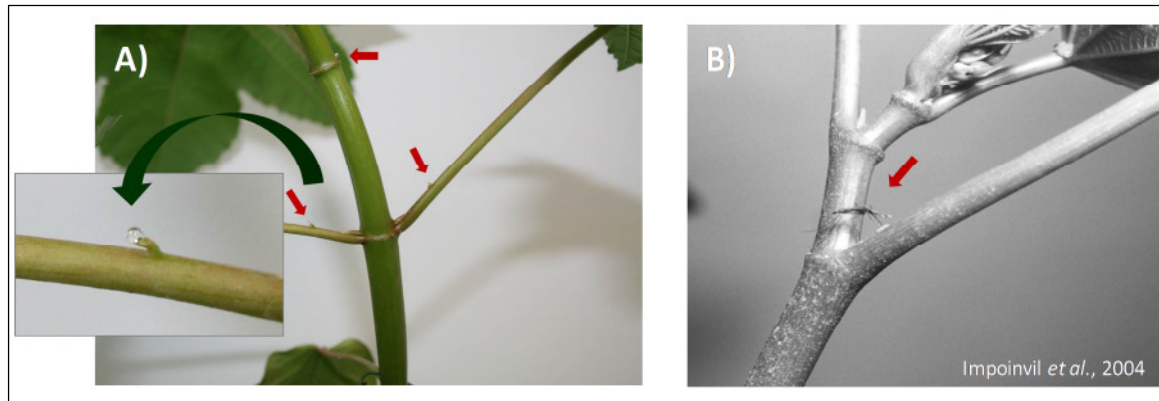
Da *Ricinus* sich aber nur äußerst schwer *in vitro* regenerieren und genetisch transformieren lässt, ist es in den letzten 30 Jahren kaum gelungen, eine standardisierte, reproduzierbare Methode mit ausreichender Effizienz zu entwickeln (Athma & Reddy, 1983; Reddy *et al.*, 1987; Sangduen *et al.*, 1987; Reddy & Bahadur, 1989; Sarvesh *et al.*, 1992; Molina & Schobert, 1995; Sujatha & Reddy, 1998; Sujatha & Sailaja, 2005). Nachdem sich die meisten der früheren Untersuchungen unter Verwendung von vegetativem Gewebe als ineffizient oder schwer reproduzierbar herausgestellt hatten (Reddy *et al.*, 1987; Reddy & Bahadur, 1989; Sarvesh *et al.*, 1992), fokussierte man sich auf die Verwendung meristematischen Gewebes, um die Regenerationseffizienz zu erhöhen (Lakshmi & Bahadur, 1997; Molina & Schobert, 1995; Sujatha & Reddy, 1998). Dabei war eine *Agrobacterium*-vermittelte Transformation möglich, die Rate an putativen Transformanten blieb jedoch sehr niedrig (Sujatha & Sailaja, 2005). Es besteht also nach wie vor Bedarf an einem verbesserten Regenerations- und Transformationsprotokoll, das für die Integration von Transgenen herangezogen werden kann (Sujatha *et al.*, 2008).



**Abbildung 1.12. *Ricinus communis* L.** Die monözische Pflanze bildet große Blütenstände, wobei die an den roten Stempeln zu erkennenden weiblichen Blüten in der oberen, die männlichen Blüten in der unteren Hälfte gebildet werden (Abbildung modifiziert nach [3]).

*Ricinus communis* besitzt darüber hinaus eine Vielzahl extra-floraler Nektarien an den Petiolen seiner Blätter (Abb. 1.13 A). Es wurde dokumentiert, dass der hier austretende Nektar Moskitos (*Culex* spp.) als Nahrungsquelle dient (Taylor & Foster, 1996). Bei den meisten Mosquito-Arten ist im Übrigen der Nektar aus Blüten oder extra-floralen Nektarien die bevorzugte Zuckerquelle des

Weibchens (Manda *et al.*, 2007). So ist auch von *Anopheles gambiae*, dem bedeutendsten Malaria-Vektor, bekannt, dass sie sich ferner von zuckerhaltigen Pflanzensäften ernährt. Zudem konnte *A. gambiae* bei der Nahrungsaufnahme an *Ricinus* beobachtet werden (Abb. 1.13 B; Impoinvil *et al.*, 2004).



**Abbildung 1.13. Extra-florale Nektarien von *Ricinus communis* (A) und *Anopheles gambiae* bei der Nahrungsaufnahme (B).** Weitere Erklärungen im Text. Abbildung B verändert nach Impoinvil *et al.*, 2004.

Trotz der eher ungünstigen Transformationsaussichten erscheint *Ricinus communis* daher als geeignetes Expressionssystem für die Akkumulation von rekombinanten Proteinen im Phloem: würden die unter Verwendung phloemspezifischer Promotoren im Phloemsaft exprimierten Proteine in den Nektar übergehen, so könnte *Ricinus communis* als Applikationssystem dienen und auf diesem Wege inhibitorische Proteine an *Anopheles* verfüttert werden, die die Entwicklung von *Plasmodium* im Vektor hemmen und/oder den Vektor selbst angreifen. Untersuchungen mit *Arabidopsis thaliana* zeigten, dass das 27 kDa große GFP (Chalfie *et al.*, 1994) unter der Kontrolle des Begleitzellen-spezifischen Promotors *SUC2* aus *A. thaliana* (*AtSUC2*) durch die Plasmodesmata aus den Begleitzellen in die Siebelemente gelangt und zusammen mit den Assimilaten zu den Orten des Verbrauchs transportiert wird (Imlau *et al.*, 1999). Ein Transport von im Phloemsaft von *Ricinus communis* akkumulierten Proteinen zu den Nektarien scheint daher wahrscheinlich.

## 1.6 Fragestellung

Auf der Suche nach neuen Möglichkeiten werden im Kampf gegen die Malaria zunehmend auch innovative Ideen und ungewöhnliche Strategien diskutiert und verfolgt. Die verfügbaren Strategien, die Übertragung von *Plasmodium* auf den menschlichen Wirt zu blockieren, basieren auf der Kontrolle des Vektors (z. B. durch den Einsatz von Insektiziden und insektizid-beschichteten Bettnetzen) oder der Behandlung der Infizierten mit Malaria-Therapeutika. Dabei

wurden verschiedene Peptide, Proteine und Antikörper beschrieben, die mit den Sexualstadien von *Plasmodium* innerhalb der Stechmücke interferieren und infolgedessen die Übertragung auf den Menschen verhindern können (vergleiche Kap. 1.4). Eine Applikation dieser transmissionsblockierenden Proteine an *Anopheles* wird bisher nur über die Impfung der von Malaria betroffenen Menschen mit diesen sogenannten TBVs diskutiert. Neben den üblichen Anforderungen, die an einen Impfstoff gestellt werden, ist hierbei jedoch zu bedenken, dass durch die Impfung mit einer TBV nur ein indirekter Nutzen für die geimpfte Person entsteht, da der Impfstoff nicht direkt vor einer Infektion oder einem fatalen Verlauf schützt. Dies könnte sich negativ auf die Akzeptanz einer solchen Impfung auswirken, die jedoch erst ihre Wirkung entfalten wird, wenn sich möglichst viele Menschen in einem bestimmten Gebiet impfen lassen. Daher erscheint es sinnvoll, nach einem alternativen Applikationsweg dieser transmissionsblockierenden Proteine zu suchen.

Alle *Anopheles*-Stechmücken, auch die Weibchen, bedürfen der Aufnahme von Zuckern, wobei zuckerhaltige Pflanzensäfte aus Blüten oder extra-floralen Nektarien die bevorzugte Zuckerquelle darstellen (Foster, 1995). Mit einem geeigneten pflanzlichen Expressionssystem könnten inhibitorische Peptide oder Proteine auf diesem Wege den Moskitos verabreicht werden, mit Strukturen des Mitteldarmepithels, der Speicheldrüse der Stechmücke oder der entsprechenden Entwicklungsstadien von *Plasmodium* interagieren und so letztendlich dazu beitragen, die Transmission des Parasiten auf den Menschen zu senken. Zur Schaffung der Grundlagen für diesen Ansatz sollten im Rahmen dieser Arbeit folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Es konnte gezeigt werden, dass transgene Moskitos, die das *salivary gland and midgut peptide 1* (SM1-Peptid) unter der Kontrolle des *A. gambiae* Carboxypeptidase (CP)-Promotors exprimierten und in das Mitteldarm-Lumen sezernierten, nach der Fütterung mit infektiösem Blut (*P. berghei*) eine Inhibition der Oocysten-Bildung von durchschnittlich 81.6 % sowie eine deutlich reduzierte Anzahl an Sporozoiten aufwiesen, wodurch die Transmissionsrate signifikant gesenkt werden konnte (Ito *et al.*, 2002). Das nur zwölf Aminosäuren große SM1-Peptid sollte im Rahmen dieser Arbeit in die Cystin-Knoten-Mikroproteine MCoTI-II und AGRP integriert werden, die durch ihre besondere Struktur mit drei intramolekularen Disulfidbrücken eine außergewöhnliche chemische, thermische und proteolytische Stabilität besitzen. Daher bieten sie das ideale Rückgrat für oral zu applizierende antiplasmodiale Peptide, denen sie die nötige Stabilität für eine verlängerte Verweilzeit im Mitteldarm von *Anopheles* verleihen. Die verschiedenen Varianten sollten zur schnellen Generierung ausreichender Proteinmengen für erste Untersuchungen im bakteriellen und transienten pflanzlichen Expressionssystem produziert und charakterisiert werden. Die Charakterisierung sollte vor allem den Vergleich der Expressionssysteme hinsichtlich der Funktionalität der gereinigten Peptide beinhalten. Untersuchungen zur inhibitorischen Wirksamkeit sollten durch Fütterungsexperimente mit *Anopheles* erfolgen, denen die Peptide mit einer Zuckermahlzeit verabreicht werden

sollten. Anschließend sollte die Entwicklung von *P. berghei* analysiert und so das inhibitorische Potential der Peptide beurteilt werden.

2. Die ICK-Proteine PcFK1 und PcFK2 aus dem Toxin der Vogelspinne *Psalmopoeus cambridgei* weisen *in vitro* eine starke antiplasmodiale Wirksamkeit gegen die intra-erythrozytären Stadien von *P. falciparum* auf, wobei der molekulare Angriffspunkt und Wirkmechanismus nicht bekannt sind (Choi *et al.*, 2004). Um die breite Anwendbarkeit des oben beschriebenen Ansatzes zu testen, sollten PcFK1 und PcFK2 als weitere Peptide mit bekannter antiplasmodialer Wirksamkeit in gleicher Weise generiert, charakterisiert und in Fütterungsexperimenten mit *Anopheles* hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirksamkeit auf *P. berghei* untersucht werden.
3. Neben der Produktion der inhibitorischen Kandidatenproteine in heterologen Expressionssystemen und deren Evaluation in Fütterungsversuchen mit *Anopheles* sollten die A-Domäne des TRAP, Pfs25 und Pfs28 als plasmodiale Antigene sowie das *Anopheles* Saglin als Zielstruktur im Moskito heterolog im bakteriellen bzw. transienten Expressionssystem produziert werden. Dies sollte die Grundlage für weitere Arbeiten bilden und unter Verwendung einer Phagenbibliothek die Identifikation bindender Strukturen ermöglichen, die als antiplasmodiale Antikörperfragmente wiederum in Pflanzen exprimiert werden und dazu beitragen könnten, die Transmission des Parasiten von der Mücke auf den Menschen zu blockieren.
4. Das transiente Expressionssystem, das außer der möglichen schnellen Verfügbarkeit der zu testenden Peptide auch die Vorteile der pflanzlichen Proteinproduktion z. B. hinsichtlich der Proteinfaltung bietet, wurde hier als zeitgünstigere aber gleichwertige Alternative zur stabilen pflanzlichen Transformation gewählt. Parallel zu diesem Ansatz sollte jedoch die aufwendigere stabile Expression der inhibitorischen Peptide unter Verwendung des *AtSUC2*-Promotors in *Ricinus communis* versucht werden, um der Frage nachzugehen, ob die inhibitorischen Kandidatenproteine SM1, PcFK1 und PcFK2 durch die Expression im Phloem auch im Nektar nachweisbar wären und auf diesem Wege *Anopheles* verabreicht werden könnten. *Ricinus communis* erscheint gerade aufgrund seiner zahlreichen extra-floralen Nektarien und seiner Verbreitung in den Tropen und Subtropen als Applikationssystem antiplasmodialer Peptide geeignet.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Technische Ausstattung

##### Messen / Wiegen

Analysenwaage ATILON ATL-84-I

Pipetten (Research, 10 µl, 100 µl, 1000 µl)

Präzisionswaage ATILON ATL-2202

AccuLab Sartorius (Göttingen)

Eppendorf (Hamburg)

AccuLab Sartorius (Göttingen)

##### Rühren, Schütteln, Temperieren

Brutschrank B 5050 E

Inkubationsschüttler HT Ecotron

Inkubationsschüttler MaxQ 4450

Magnetrührer RCT Basic

Mikrowelle Compact Y53

Schüttler Shaker Dos-10L

Thermoblock Typ 5000 6101

Thermomixer Comfort

Vortex Mixer Typ VF2

Wasserbad Typ 3042

Heraeus (Hanau)

Infors (Bottmingen, CH)

Thermo Scientific (Waltham, USA)

IKA Labortechnik (Staufen)

Moulinex (Lyon, FR)

NeoLab (Heidelberg)

Liebisch (Bielefeld)

Eppendorf (Hamburg)

Janke & Kunkel (Staufen)

Köttermann (Uetze / Hänigsen)

##### Zentrifugieren

Kühlzentrifuge 5417 R

Kühlzentrifuge 5804 R

Eppendorf (Hamburg)

Eppendorf (Hamburg)

##### Dokumentation

Digitalkamera

Intas UV-Systeme-Geldokumentation

Panasonic

Intas (Göttingen)

##### Spektrometer / Photometer

Microplate Reader INFINITE M200

NanoDrop® ND-1000 Spektralphotometer

Spektrophotometer Typ 6310

Tecan (Crailsheim)

Peqlab (Erlangen)

Jenway

**PCR-Geräte**

Mastercycler eppgradient S	Eppendorf (Hamburg)
Thermocycler Primus 25 advanced®	Peqlab (Erlangen)

**Elektrophorese / Transfer**

Elektrophorese Power Supply PAC 300	BioRad (Hercules, USA)
PerfectBlue™ Systeme	Peqlab (Erlangen)
PerfectBlue™ Tank-Elektroblotter	Peqlab (Erlangen)

**Sonstige**

Autoklav VX-95	Systec (Wettenberg)
Digital pH-Meter Typ 647-1	Knick (Berlin)
Profinia™ Protein Purification Instrument	BioRad (Hercules, USA)
Ultraschallstab SONOPLUS UW 60	BandelinElectronic (Bandelin)

**2.1.2 Verbrauchsmaterialien****2.1.2.1 Chemikalien**

Die handelsüblichen Chemikalien wurden in der jeweils erforderlichen Reinheit von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

**Ausgewählte Chemikalien**

2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	AppliChem (Darmstadt)
3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat (CHAPS)	AppliChem (Darmstadt)
4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid (AEBSF)	AppliChem (Darmstadt)
6-Benzylaminopurin (BAP)	Duchefa (Haarlem; NL)
Acrylamid/Bisacrylamid 37%	AppliChem (Darmstadt)
Agarose ( <i>for routine use</i> )	Sigma (Deisenhofen)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	AppliChem (Darmstadt)
Coomassie Brilliant Blau G-250	AppliChem (Darmstadt)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem (Darmstadt)
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem (Darmstadt)
Ethidiumbromid	AppliChem (Darmstadt)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck (Darmstadt)
Hefeextrakt	AppliChem (Darmstadt)
Imidazol	AppliChem (Darmstadt)
Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid (IPTG)	AppliChem (Darmstadt)



Magermilchpulver	AppliChem (Darmstadt)
Murashige & Skoog-Salze (MS-Salze)	Duchefa (Haarlem, NL)
Myo-Inositol	AppliChem (Darmstadt)
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	AppliChem (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem (Darmstadt)
Natrium-L(+)-ascorbat	AppliChem (Darmstadt)
peqGold TriFast™	Peqlab (Erlangen)
Silbernitrat	Roth (Karlsruhe)
Tween 20	Roth (Karlsruhe)
β-Mercaptoethanol	AppliChem (Darmstadt)

### 2.1.2.2 Antibiotika

Die verwendeten Antibiotika wurden von den in Tabelle 2.1 aufgeführten Firmen bezogen und als Stammlösung im geeigneten Lösungsmittel angesetzt, sterilfiltriert und dem entsprechenden autoklavierten Nährmedium bis zur gewünschten Endkonzentration zugesetzt.

Tabelle 2.1: Übersicht der verwendeten Antibiotika mit Angabe der entsprechenden Konzentration.

Antibiotikum	Hersteller	Endkonzentration [µg/ml]
Ampicillin	Applichem (Darmstadt)	50-100
Carbenicillin	Duchefa (Haarlem, NL)	20-50
Gentamycin	Duchefa (Haarlem, NL)	15
Hygromycin B	Duchefa (Haarlem, NL)	20-60
Kanamycin	Applichem (Darmstadt)	15-50
Rifampicin	Duchefa (Haarlem, NL)	50
Tetracyclin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	12,5

### 2.1.2.3 Nukleinsäuren, Nukleotide, Enzyme

Desoxynukleotide	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
DNase I	MBI-Fermentas (St. Leon-Rot)
GeneRuler™ 100bp Ladder	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Lysozym	AppliChem (Darmstadt)
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	MBI-Fermentas (St. Leon-Rot)
Restriktionsendonukleasen	MBI-Fermentas (St. Leon-Rot)
RNase A	AppliChem (Darmstadt)

T4 DNA-Ligase	MBI-Fermentas (St. Leon-Rot)
Taq DNA-Polymerase	MBI-Fermentas (St. Leon-Rot)
Trypsin (aus Rinderpankreas)	AppliChem (Darmstadt)

#### 2.1.2.4 Antikörper

Die verwendeten Primär- und Sekundär-Antikörper (Tabelle 2.2) wurden von der Firma *Santa Cruz Biotechnology, Inc.* bezogen.

Tabelle 2.2: Übersicht der verwendeten Antikörper.

Antikörper	Organismus und Konzentration	Kat. Nr.
GFP (FL)	rabbit polyclonal IgG, 200 µg/ml	sc-8334
His-probe (AD1.1.10)	mouse monoclonal IgG <sub>1</sub> , 200 µg/ml	sc-53073
Goat anti-mouse IgG-HRP	goat IgG, 200 µg/0.5 ml	sc-2005
Goat anti-mouse IgG-AP	goat IgG, 200 µg/0.5 ml	sc-2008
Mouse anti-rabbit IgG-HRP	mouse IgG, 200 µg/0.5 ml	sc-2357

#### 2.1.2.5 Molekularbiologische Kits

##### Amplifizierung und Klonierung

The Original TA Cloning® Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
Zero Blunt® PCR Cloning Kit	Invitrogen (Karlsruhe)

##### Plasmidpräparation und DNA-Elution

GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
NucleoSpin® Gel and PCR clean-up Kit	Macherey-Nagel (Düren)
PureLink™ HiPure Plasmid Purification Kit	Invitrogen (Karlsruhe)

##### Proteinreinigung und -detektion

1-Step™ Turbo TMB-ELISA	Pierce (Rockford, USA)
BCA Protein Assay Kit	Pierce (Rockford, USA)
Enhanced Cheluminate-HRP Detection Kit	Applichem (Darmstadt)
Profinia™ IMAC Kits	BioRad (Hercules, USA)
Profinia™ Native IMAC Starter Kit	BioRad (Hercules, USA)

**2.1.2.6 Weitere Verbrauchsmaterialien****Filter und Membranen**

Faltenfilter	Hartenstein (Würzburg)
Hybond-P PVDF-Membran	Amersham (Freiburg)
Hyperfilm™ MP	Amersham (Freiburg)
Nylonmembran Porablot NY plus	Macherey-Nagel (Düren)
Partikelfilter (0.2 µm, 0.45 µm)	Hartenstein (Würzburg)
Rotilabo® Spritzenfilter PVDF steril	Roth (Karlsruhe)
Whatman-Papier	Maidstone (GB)

**Gelelektrophorese**

6 x DNA Loading Dye	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
NuPAGE® SDS-Gele 12.5%	Invitrogen (Karlsruhe)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)

**Chromatographie**

Bio-Scale Mini Bio-Gel P-6 Desalting Cartridges, 5 ml	BioRad (Hercules, USA)
Bio-Scale Mini Profinity IMAC Cartridges, 1 ml	BioRad (Hercules, USA)

**Filme und Filmentwicklung**

Entwickler Kodak	Hartenstein (Würzburg)
Fixierer Kodak	Hartenstein (Würzburg)
Fuji medical X-Ray Film, 100 NIF	Hartenstein (Würzburg)

**Steriles Material und Einmalartikel**

PCR-Gefäße, Kultur-Röhrchen,	
Falcon-Röhrchen (15 und 50 ml),	
Petrischalen, Pipettenspitzen,	
Reaktionsgefäße, Serologische Pipetten,	
1 ml-Spritzen zur Infiltration,	
Spritzen 60 ml, (Einmal-)Küvetten	Sarstedt, Hartenstein

Die Sterilisation von Verbrauchsmaterial erfolgte durch Hitzesterilisation bei 120 °C, 30 min (Plastikartikel) bzw. bei 160 °C, 8 h (Glasgeräte).

### 2.1.3 Material zur sterilen Kultivierung von Pflanzen

Magenta-Boxen

Magenta Corp. (Chicago, USA)

Kulturgefäße (0.25 – 1 l)

Weck GmbH &amp; Co. KG (Wehr)

### 2.1.4 Wichtige Puffer und Lösungen

Die in der nachfolgenden Tabelle angeführten Lösungen wurden zumeist in 10-facher Konzentration angesetzt und falls erforderlich sterilisiert (121 °C, 20 min oder Sterilfiltration, 0.2 µm). Der pH-Wert wurde mit NaOH, KOH oder HCl eingestellt.

Tabelle 2.3: Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen.

Lösung	Zusammensetzung	pH
<b>ICON Puffer</b>	10 mM MgSO <sub>4</sub> 10 mM MES	---
<b>Kolloidale Coomassie-Färbelösung</b>	0.12 % (w/v) Coomassie G-250 10 % (w/v) (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10 % (v/v) Phosphorsäure 20 % (v/v) Methanol	---
<b>LEW</b>	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 300 mM NaCl	8.0
<b>PBS</b>	23 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 17 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 mM NaCl	7.4
<b>PBST</b>	23 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 17 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 mM NaCl 0.05 % (v/v) Tween 20	7.4
<b>Phosphatpuffer</b>	67 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7.6
<b>Profinia™ Native IMAC Wash Buffer 1</b>	300 mM KCl 50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5 mM Imidazol	8.0

<b>Profinia™ Native IMAC Wash Buffer 2</b>	300 mM KCl 50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM Imidazol	8.0
<b>Profinia™ Native IMAC Elution Buffer</b>	300 mM KCl 50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 250 mM Imidazol	8.0
<b>Profinia™ Desalting Buffer</b>	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 4.3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 8.1 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7.4
<b>Profinia™ Cleaning Solution 1</b>	500 mM NaCl 50 mM Tris	8.0
<b>Profinia™ Cleaning Solution 2</b>	500 mM NaCl 100 mM NaOAc	4.5
<b>Profinia™ Storage Solution</b>	2 % (v/v) Benzylalkohol	---
<b>TAE</b>	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA	---
<b>TE</b>	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA	7.4
<b>Transferpuffer</b>	25 mM Tris 192 mM Glycin 20% (v/v) Methanol	---

## 2.1.5 Nährmedien

### 2.1.5.1 Medien zur Anzucht von Bakterien

Tabelle 2.4: Übersicht der Bakteriennährmedien.

Medium	Zusammensetzung	pH
LB-Medium (Maniatis <i>et al.</i> 1989; (Bertani, 2004)	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl	7.0
LB-Nähragar	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl 15 g/l Bacto-Agar	7.0

### 2.1.5.2 Medien zur Anzucht von Pflanzen

Tabelle 2.5: Übersicht der Pflanzennährmedien.

Medium	Zusammensetzung	pH
MS-Medium	4,3 g/l MS-Salze 30 g/l Saccharose 0,1 g/l Myo-Inositol 1 ml/l B5 Vitamine 7 g/l Phyto-Agar	5.7
Proliferation	MS medium 0.1 mg/l BAP / 0.5 mg/l TDZ (250 mg/l Cefotaxim)	5.7
Selektion	MS medium 0.5 mg/l BAP 250 mg/l Cefotaxim 20 – 60 mg/l Hygromycin	5.7
Wurzelinduktion	MS medium (0.5 g/l MES) 5 µM IBA (250 mg/l Cefotaxim) (20 – 60 mg/l Hygromycin)	5.7

Nach Einwaage der festen Komponenten und Addition von Wasser wurden die Nährmedien nach Einstellung des pH-Wertes zur Sterilisation 20 min bei 121 °C autoklaviert und nach Abkühlen auf etwa 60 °C die entsprechenden Antibiotika in der erforderlichen Konzentration zugegeben (siehe Tabelle 2.1).

### 2.1.6 Bakterienstämme

#### ***Escherichia coli* TOP 10** (Invitrogen):

Dieser Stamm besitzt eine hohe Transformationseffizienz und ist ideal für effizientes Klonieren und Propagieren von Plasmiden.

**Genotyp:**  $F^- mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \phi80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1 araD139 \Delta(ara-leu)7697 galJ galK rpsL (Str^R) endA1 nupG \lambda^-$ .

#### ***Escherichia coli* M15 [pREP4]** (Qiagen):

Dieser Stamm ist ein K-12-Derivat und ideal zur Verwendung zusammen mit pQE-Vektoren. Er besitzt das Plasmid pREP4 (3749 bp), das durch das *neo*-Gen Resistenz gegen Kanamycin vermittelt. Es kodiert zudem für den lac-Repressor. Dadurch wird eine Regulation der Expression der auf dem pQE-Vektor kodierenden Gene ermöglicht.

**Genotyp:**  $(Nal^S Str^S Rif^S) thr^- lac^- ara^- gal^- mtl^- F^- recA^+ uvr^+ lon^+$

#### ***Escherichia coli* Origami™ (DE3)** (Novagen):

Dieser Stamm ist ein K-12-Derivat, der Mutationen im Thioredoxin-Reduktase- (*trxB*) und Glutathion-Reduktase-Gen (*gor*) besitzt, wodurch die Ausbildung von Disulfidbrücken im *E. coli*-Cytoplasma deutlich erhöht werden kann. Die *trxB*- und *gor*-Mutationen können mit Kanamycin und Tetracyclin selektiert werden. Die Origami-Stämme sind kompatibel mit Ampicillin-Resistenz vermittelnden Plasmiden und ideal zur Verwendung von pET-32-Vektoren, da hier das Thioredoxin-Fusionstag noch zusätzlich die Ausbildung von Disulfidbrücken im Cytoplasma begünstigt.

Dieser Stamm ist außerdem ein Lysogen von  $\lambda$ DE3 und trägt daher eine chromosomale Kopie des T7 RNA Polymerase-Gens, das unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors steht. Somit kann die Produktion von Proteinen durch die Induktion mit IPTG erfolgen.

**Genotyp:**  $\Delta(ara-leu)7697 \Delta lacX74 \Delta phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F'[lac^+ lacI^f pro] gor522::Tn10 (Tc^R) trxB::kan (DE3)$

**Escherichia coli BL21(DE3)** (Novagen):

BL21(DE3) *E. coli* sind ideal zur Verwendung mit Bakteriophage T7-Promotor-basierten Expressionssystemen, z. B. pET. Sie enthalten das  $\lambda$ DE3-Lysogen, das das Gen für die T7 RNA-Polymerase unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors trägt. Zur Induktion der Expression der T7 RNA-Polymerase wird IPTG benötigt.

Bei diesem Stamm handelt es sich außerdem um einen *E. coli* B/r-Stamm, der also keine *lon*-Protease enthält. Zudem ist er defizient in der Outer Membrane Protease, OmpT. Durch das Fehlen dieser beiden wichtigen Proteasen kann hier der Abbau heterolog exprimierter Proteine deutlich reduziert werden.

**Genotyp:** F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3).

**Agrobacterium tumefaciens GV3101** (DSM No. 12365, DSMZ, Braunschweig):

Dieser Stamm trägt chromosomal ein Rifampicin-Resistenzgen und besitzt außerdem das Ti-Plasmid pMP90RK, das Resistenz gegen Gentamycin vermittelt und die Virulenz-Gene für den T-DNA-Transfer trägt, das aber keine eigene T-DNA-Region für den Transfer von DNA in die Pflanze besitzt.

Zellen von *A. tumefaciens* GV3101 wurden zur transienten Expression in *Nicotiana benthamiana* mit den (modifizierten) Plasmiden des *ICON*-Systems transformiert und in Rifampicin- (50 µg/ml), Gentamycin- (15 µg/ml) und, je nach Plasmid, Carbenicillin- (50 µg/ml) bzw. Kanamycin-haltigem (50 µg/ml) LB-Medium bei 28 °C kultiviert.

**Genotyp:** PM90RK GM<sup>R</sup> Rif<sup>R</sup>

**2.1.7 Oligonukleotide**

Die verwendeten Oligonukleotid-Primer zur Amplifikation und Klonierung gewünschter DNA-Segmente wurden von der Firma *Eurofins MWG Operon* (Ebersberg) bezogen. Die Ausgangskonzentration nach Lösen des lyophilisierten Primers betrug 200 pmol/µl, die Arbeitskonzentration der Primerlösungen betrug 10 pmol/µl.

Die Primer und ihre Sequenzen sind der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 2.6: Übersicht der verwendeten Oligonukleotidprimer.

Primer	Primersequenz 5' → 3'
PICH10990 for	CGGGCGCGTACTCCACCTCAC
PICH10990 rev	CGCCACCCCTACGGATTTACAC
PT7P for	TAATACGACTCACTATAGGG
PT7T rev	GCTAGTTATTGCTCAGCGG



hptII for	GATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCGACG
hptII rev	CTATTTCTTTGCCCTCGGACGAGTGCTGG
PYFP 105	ATCTCGAGATGGTGAGCAAGGGCGAGG
PGFP 201	ATCTAGATTAGTGATGGTGATGGTGATGCTTGACAGCTCGTCCATGCCG
PPCFKI 102	TGTGTCTACGTCCCAGCACAAAACCCATG
PPCFKI 103	TTGCAGGGGACTCCAGTGCAGATATGGAAAATGC
PPCFKI 104	CTTGTACAAGTTGGTAGATAGTCTAGA
PPCFKI 105	AGCTCGAGGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGCCTGTGGCATATTGCATGAC AAC
PPCFKI 201	AG TCTAGACTATCTACCAACTTGACAAGGCATTTTCCATATC
PPCFKI 202	TGCACTGGAGTCCCCTGCAACATGGGTTTTGTG
PPCFKI 203	CTGGGACGTAGACACAGTTGTCATGCAATATGCC
PPCFKII 102	AGCCGAGACTCGCCAATGATTCAGGAGAG
PPCFKII 103	AAGATGCTTACCAGCAGGCAAGACTTGTGTG
PPCFKII 104	AGGGGACCTATGAGAGTACCGTGCTGTGG
PPCFKII 105	ATCATGCTCACAGAATAAATGTACCTG
PPCFKII 106	AGCTCGAGGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGCAGAAATTAGTGCAAAAATG GA
PPCFKII 201	AG TCTAGATCAGGTACATTTATTCTGTGAGC
PPCFKII 202	ATGATCCACAGCACGGTACTCTCATAGGTCCCCTCACACAAGTC
PPCFKII 203	TTGCCTGCTGGTAAGCATCTTCTCTCCTGAATC
PPCFKII 204	ATTGGCGAGTCTCGGCTGTCCATTTTTGCAC
PGFP 111	AGTTTGGTCTCAAGGTATGCATCACCATCACCATCACATGGTGAGCAAGG GCGAGGAGC
PGFP 108	AGCCATGGATCATCACCATCACCATCACATGGTGAGCAAGG
PGFP 211	GGTCTAGATTACTCGAGCTTGACAGCTCGTCCATGCCG
PGFP for	AGCCATGGATGCATCACCATCACCATCACATGGTGAGCAAGGGCGAGGA GC
PTEV-MC-SM1 for	CTCGAGGAAAACCTGTACTTCCAGTCCATGGGCGTGCCATGTC
PTEV-MC-SM1 rev	TCTAGATTACCCGCAGTAACCGTTACCACGGC
PMC-WT 101	CTCGAGGAAAACCTGTACTTCCAGTCCATG
PMC-WT 102	GGGGTTTGCCCGAAAATCCTGAAAAAATGCCG
PMC-WT 103	TCGTGACTCCGATTGCCAGGTGCTTGATC
PMC-WT 104	TGCCGTGGTAACGGTTACTGCGGTAAAGC
PMC-WT 201	TCTAGATTAAAGCTTAACCGCAGTAACCG
PMC-WT 202	TTACCACGGCAGATGCAAGCACCTGGGC

PMC-WT 203	AATCGGAGTCACGACGGCATTTCAGG
PMC-WT 204	ATTTTCGGGCAAACCCCCATGGACTGGAAGTAC
PMC-WT 205	CTCGAGTTAAAGCTTAACCGCAGTAACCG
PPfs25 for	CGCCATGGAAGTTACCGTGGATACTGTATGC
PPfs25 rev	AAGCTTTTAGTGATGGTGATGGTGATGCTCGAGGGACTGGAAGTACAGG TTTCCATTATAAAAAAGC
PPfs28 for	CGCCATGGGGGTTACTGAAAATACAATATG
PPfs28 rev	TCTAGATTAGTGATGGTGATGGTGATGCTCGAGGGACTGGAAGTACAGG TTTTCTATTAACAATTTA
PTEV-AG-SM1 for	CTCGAGGAAAACCTGTACTTCCAGTCCATGGGGTGCGTTCGTC
PTEV-AG-SM1 rev	TCTAGATTAACGGCAATTGCAAATACTCTG
PTRAP-Ado for	CGCCATGGGTCAGGAAATTCTTGACGAA
PTRAP-Ado rev	CGGGATCCAAGAGCAACTTTTCTACTTC
M13 for	GTAAAACGACGGCCAG
M13 rev	CAGGAAACAGCTATGA
PSaglin-Ss for	AGCCATGGGCGGCCAGGAAGCAAC
PSaglin rev	CGCTCGAGTTAGGATCCGCCGGACGACTTGCGCGAC

### 2.1.8 Plasmide

## Klonierungsvektoren

**pCR<sup>®</sup>-Blunt** (3.5 kb, Invitrogen, Karlsruhe):

Dieser Vektor ist Bestandteil des Zero Blunt® PCR Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe) und findet als Klonierungsvektor Verwendung. Er liegt in linearisierter Form vor, wobei seine glatten Enden am 3'-Ende Phosphatgruppen besitzen, die die Insertion von PCR-Produkten mit glatten Enden ermöglichen. Die Selektion erfolgt über das *ccdB*-Gen, welches durch die Insertion eines DNA-Fragmentes unterbrochen wird. Zusätzlich ermöglicht ein Kanamycin-Resistenzgen die Selektion von transformierten Zellen mittels Kanamycin. Alternativ kann auch mit Zeocin™ selektiert werden. Die Insertionsstelle (MCS) wird von Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonuklease *EcoRI* flankiert, so dass das Ergebnis der Ligation und Transformation durch einen entsprechenden Restriktionsverdau überprüft werden kann. Desweiteren sind M13 *forward* und - *reverse* Primer-Bindungsstellen vorhanden, die z. B. zur Sequenzierung des inserierten DNA-Fragmentes herangezogen werden können.

**pCR<sup>®</sup> 2.1** (3.9 kb, Invitrogen, Karlsruhe):

Dieser Vektor des TA Cloning<sup>®</sup> Kits (Invitrogen, Karlsruhe) dient zur Klonierung von *Taq*-Polymerase-amplifizierten PCR-Produkten. Der linearisierte Vektor besitzt hierzu einen 3'-Thymidin-Überhang. Zur Selektion kann Kanamycin oder Ampicillin verwendet werden, wobei auch eine Blau/Weiß-Selektion möglich ist. Die Insertionsstelle wird von *EcoRI*-Erkennungssequenzen und Primer-Bindungsstellen für M13 *forward* und – *reverse* flankiert.

**pGEM<sup>®</sup>-T und pGEM<sup>®</sup>-T Easy** (3 kb, Promega):

Die linearisierten Vektoren besitzen ebenso einen 3'-Thymidin-Überhang an beiden Enden der Insertionsstelle. Daher können diese Vektoren gleichermaßen zur Klonierung von PCR-Produkten verwendet werden, die mit Polymerasen generiert wurden, die 3'-A-Überhänge erzeugen. Zur Selektion kann Ampicillin verwendet werden; auch eine Blau/Weiß-Selektion ist möglich.

**Expressionsvektoren****pPSI** (12.5 kb, Becker *et al.*, 1992):

Bei diesem Pflanzenexpressionsvektor handelt es sich um einen Abkömmling des Vektors pGPTV-Kan (Becker *et al.*, 1992). Im Vektor pPSI erfolgt die Expression unter der Kontrolle des 35S Promotors (P35S) des Blumenkohl-Mosaikvirus (*cauliflower mosaic virus*, CaMV). Zur Selektion enthält der Vektor das Gen für eine Neomycin-Phosphotransferase, *nptII*, das Resistenz gegenüber bestimmten Aminoglycosid-Antibiotika wie Kanamycin oder Hygromycin vermittelt.

**pQE60<sup>®</sup>** (3.4 kb, Qiagen, Hilden):

Im bakteriellen Expressionsvektor pQE60 der Firma *Qiagen* steht die Transkription unter der Kontrolle eines T5-Promotors und zwei *lac*-Operationserkennungssequenzen. Eine *in frame*-Ligation in die MCS, bestehend aus *NcoI*, *BamHI* und *BglII*, ermöglicht eine C-terminale Fusion des rekombinanten Proteins mit sechs Histidinen. Der Vektor vermittelt Resistenz gegenüber Ampicillin. Die Genexpression ist durch den lac-Repressor regulierbar.

**pET-32a(+)** und **pET-28a(+)** (5.9 und 5.4 kb, Novagen):

Bei der Expression von Proteinen in *E. coli* ermöglicht das pET-Vektorsystem, ursprünglich konstruiert von Studier und Moffatt (1986), eine einfache Klonierung, Detektion und Reinigung von Zielproteinen. Diese Vektoren enthalten einen Promoter des Bakteriophagen T7, an den die T7-RNA-Polymerase sehr spezifisch bindet. Durch die Addition von IPTG kann die Proteinexpression induziert werden. Beide Vektoren enthalten zudem zahlreiche *tags*, die zur Detektion oder zur Reinigung der exprimierten Proteine herangezogen werden können. Im pET-32a-Vektor kann sich die Expression des Zielproteins als Thioredoxin-Fusion günstig auf die Faltung des Proteins auswirken. Daher ist dieser Vektor vor allem für die Expression von

Proteinen geeignet, die die Ausbildung von Disulfidbrücken für eine korrekte Faltung benötigen. Die Vektoren vermitteln Resistenz gegenüber Ampicillin (pET-32a) bzw. Kanamycin (pET-28a).

### **ICON-Vektoren zur transienten Expression (ICON Genetics, Halle/Saale)**

Zur transienten Proteinexpression in *Nicotiana benthamiana* wurde das auf viralen Vektoren basierende System der Firma *ICON Genetics* verwendet. Dabei liefert dieses System nicht nur die Vektoren zur Insertion der Transgene, die 3'-Pro-Vektor-Module, sondern ermöglicht es zudem, diese mit verschiedenen Targeting-Sequenzen der 5'-Pro-Vektor-Module zu kombinieren und so Zielproteine in verschiedenen Zellkompartimenten der Pflanze zu akkumulieren.

#### **pICH10990 (6441 bp):**

Bei diesem Vektor handelt es sich um ein 3'-Pro-Vektor-Modul mit MCS zur Insertion gewünschter Sequenzen. Die MCS wird strangabwärts vom *nos*-Terminator flankiert, strangaufwärts sind eine Intronsequenz und zur Rekombination mit einem 5'-Pro-Vektor-Modul die Integrase-Rekombinationsstelle *AttB* des *Streptomyces*-Phagen C31 kodiert. Der Vektor vermittelt Resistenz gegenüber Carbenicillin.

#### **pICH11599 (6446 bp):**

Auch bei diesem Vektor handelt es sich um ein 3'-Pro-Vektor-Modul. Hier können ebenfalls gewünschte Sequenzen über eine MCS eingebracht werden. Im Gegensatz zu pICH10990 können hier jedoch die Restriktionsschnittstellen von *NcoI* und *XbaI* genutzt werden. Der Vektor vermittelt ebenfalls Resistenz gegen Carbenicillin.

#### **pICH7410 (7173 bp):**

Dieses 3'-Pro-Vektor-Modul enthält *gfp* als Reportergen und kann daher in Kombination mit einem 5'-Pro-Vektor-Modul zur Funktionskontrolle des Systems herangezogen werden. Auch dieser Vektor trägt zur Selektion ein Carbenicillin-Resistenzgen.

#### **pICH15879 (13371 bp):**

Bei diesem Vektor handelt es sich dagegen um ein 5'-Pro-Vektor-Modul, das unter der Kontrolle des Aktin 2-Promotors aus *Arabidopsis thaliana*, *ACT2*, steht und neben einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase für ein Movement-Protein (MP) kodiert. Dieses ermöglicht die systemische Verteilung der entstehenden RNA in der Pflanze. Vor dem *nos*-Terminator sind die Integrase-Rekombinationssequenz *AttP* und eine Intronsequenz kodiert. Da dieser Vektor keine Sequenz besitzt, die für ein Signalpeptid zum Transport des entstandenen Proteins in ein bestimmtes Zellkompartiment kodiert, akkumuliert dieses im Cytoplasma der Pflanzenzelle. Auch pICH15879 vermittelt Resistenz gegenüber Carbenicillin.

**pICH17620** (14093 bp):

Auch bei dem Vektor pICH17620 handelt es sich um ein 5'-Pro-Vektor-Modul. Anders als pICH15879 besitzt dieser Vektor jedoch strangabwärts der MP-Sequenz eine Apoplast-Targetingsequenz, so dass das entstandene Protein im Apoplasten bzw. im ER der Zelle akkumuliert. Der Vektor vermittelt ebenso Resistenz gegenüber Carbenicillin.

**pICH10881** (12274 bp):

Bei diesem Vektor handelt es sich schließlich um das Rekombinationsmodul. Dieses kodiert für eine Integrase, die nach der Translation im Cytosol mit Hilfe eines Signalpeptids zur Kernlokation (NLS) zurück in den Zellkern geleitet wird. Hier erkennt die Rekombinase die Rekombinationsstellen des 3'- und 5'-Moduls und verknüpft diese zu einem transkribierbaren Amplikon. Der Vektor trägt ein Kanamycin-Resistenzgen zur Selektion.

### 2.1.9 Genmaterial

***gfp***: Als Matrize zur Erzeugung der *gfp*-Varianten wurde der Vektor pICH7410 (*ICON Genetics*, Halle) verwendet.

***mcoti-sm1- und agrp-sm1***: Das Genmaterial zur Amplifikation und Klonierung der *mcoti-sm1-* und *agrp-sm1*-Konstrukte stand in Form der Plasmide pET-32a(+)-TEV-MC-SM1 und pET-32a(+)-TEV-AG-SM1 (Tan Thanh Huynh, 2009, Diplomarbeit) zur Verfügung.

***mcoti001 und mcoti002***: Die Konstrukte MCOTI001 und MCOTI002 wurden von der Firma *Mr. Gene* synthetisiert und als Plasmide MCOTI001 pMK und MCOTI002 pMK zur Verfügung gestellt.

***[sm1]<sub>8</sub>***: Das Konstrukt [SM1]<sub>8</sub>, kodierend für 8 Einheiten des SM1-Peptids, wurde von der Firma *Mr. Gene* synthetisiert und als Plasmid 8XSM1 pMA zur Verfügung gestellt.

***pcfk1 und pcfk2***: Das Genmaterial von *pcfk1* und *pcfk2* wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer *PPCFKI 101*, -102, -103, -104, und -105, *PPCFKI 201*, -202, -203 sowie *PPCFKI 101*, -102, -103, -104, -105, -106, *PPCFKI 201*, -202, -203 und -204 (Tab. 2.6) erhalten.

***pbtrap-ado***: Als Matrize zur Erzeugung der A-Domäne diente genomische DNA des Stammes NK65 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Kai Matuschewski, Berlin).

***saglin\_syn***: Das Konstrukt wurde von der Firma *Mr. Gene* synthetisiert und als Plasmid *Saglin\_syn* pMK zur Verfügung gestellt.

***pfs25* und *pfs28*:** Als Template für die Generierung von *pfs25* und *pfs28* wurde genomische DNA von *Plasmodium falciparum* NF54 verwendet (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Kai Matuschewski, Berlin).

***atsuc2*:** Der *AtSUC2*-Promotor wurde freundlicherweise in Form des Plasmids pAF12 von Prof. Dr. Norbert Sauer, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, zur Verfügung gestellt.

### 2.1.10 Pflanzenmaterial

Die verwendeten Frischpflanzen stammten aus den Versuchsgewächshäusern beziehungsweise den Zellkulturkammern des Institutes für Botanik des Fachbereichs Biologie der TU Darmstadt.

***Nicotiana benthamiana*:** Die verwendeten Pflanzen wurden im Otto Stocker-Gewächshaus des Institutes für Botanik bei Temperaturen zwischen 16 und 23°C und einer Beleuchtungszeit von 16 Stunden kultiviert. Die relative Luftfeuchtigkeit betrug 60 bis 70 %.

Diese Tabakspezies diente zur transienten Expression mittels der entsprechenden *ICON*-Vektoren, wobei etwa 6 bis 10 Wochen alte Pflanzen vor der Blüte zur Infiltration mit *Agrobacterium tumefaciens* verwendet wurden. Infiltrierte Pflanzen wurden bis zur Ernte des Blattmaterials nach 5 bis 10 Tagen in der Zellkulturkammer bei einer Temperatur von 22°C und einer Beleuchtungszeit von 16 Stunden weiter kultiviert.

***Ricinus communis* L.:** Die für die Transformation nach Kapitel 2.2.3.4.2 benötigten Samen von *Ricinus communis* wurden freundlicherweise von Dr. Stefan Schneckenburger, Bot. Garten der TU Darmstadt, zur Verfügung gestellt.

### 2.1.11 *Anopheles stephensi*

Die verwendeten Stechmücken der Art *Anopheles stephensi* wurden freundlicherweise von Dr. Matthias Scheuermayer, Arbeitsgruppe PD Dr. Gabriele Pradel, Zentrum für Infektionsforschung (ZINF) der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt. Die Aufzucht der Moskitos erfolgte nach Kapitel 2.2.5.1 in einer entsprechend eingerichteten Zellkulturkammer des Institutes für Botanik des Fachbereichs Biologie der TU Darmstadt.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion dient der Amplifikation spezifischer Gensegmente (Mullis & Faloona, 1987) und wurde zur Erzeugung oder zur Detektion der verschiedenen DNA-Fragmente angewandt. Als Matrize wurden daher sowohl genomische DNA, Plasmid-DNA oder cDNA, als auch Zellsuspensionen verwendet. Entsprechend modifizierte Primer ermöglichten die Einführung von Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme oder von Sequenzvariationen in die entstehenden PCR-Produkte. Als thermostabile DNA-Polymerasen wurden entsprechend der späteren Anwendung sowohl *Taq*- (*Thermus aquaticus*) als auch *Pfu*-Polymerase (*Pyrococcus furiosus*) verwendet.

Die Amplifikation erfolgte in einem programmierbaren Thermocycler, wobei die PCR-Bedingungen vor allem in Abhängigkeit vom zu amplifizierenden Fragment und verwendeten Primer gewählt wurden.

##### PCR-Ansatz:

Template (Plasmid-DNA)	0,01-1 µg	
10 x Reaktionspuffer	5 µl	<b><u>10 x Reaktionspuffer:</u></b>
25 mM dNTP-Mix	4 µl	100 mM Tris-Cl, pH 8.8
10 mM Primer <i>forward</i>	1 µl	500 mM KCl
10 mM Primer <i>reverse</i>	1 µl	0.8 % (v/v) Triton X-100
Polymerase	1-2 Units	
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl	

##### Zeit-Temperatur-Programm:

Denaturierung	5 min	94 °C	
Denaturierung	30 s	94 °C	
Annealing	30-60 s	55 °C	30 Zyklen
Elongation	1-2 min	72 °C	
Finale Elongation	5 min	72 °C	

Die generierten Fragmente wurden im Anschluss an die PCR elektrophoretisch aufgetrennt und gegebenenfalls zur weiteren Klonierung aus der Agarose-Gel-Matrix extrahiert.

### 2.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung einzelner DNA-Fragmente erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Je nach Fragmentgröße wurden 0.5 bis 2 %-ige Agarose-Gele (w/v, in 1 x TAE-Puffer) verwendet, denen 0.1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt waren. Die Proben wurden vor der Elektrophorese zur Erhöhung ihrer Dichte und zur Markierung der Laufrichtung mit 6 x DNA-Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x TAE-Puffer bei einer angelegten Spannung von 100 bis 130 V über eine Strecke von 8 bis 15 cm. Nach erfolgter Trennung wurde die DNA unter UV-Licht einer Wellenlänge von 312 nm durch die Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids sichtbar gemacht und mit Hilfe eines DNA-Größenstandards die Fragmentgröße bestimmt. Gegebenenfalls wurden die entsprechenden DNA-Fragmente für weitere Anwendungen mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und mittels des *NucleoSpin Gel and PCR clean-up-Kits* von Macherey-Nagel entsprechend der Angaben des Herstellers aus der Gel-Matrix extrahiert.

<b>50 x TAE-Puffer:</b>	242 g/l Tris-Base 54.5 g/l Eisessig 18.5 g/l Na-EDTA pH 8.18 – 8.29 mit HCl
<b>6 x DNA-Probenpuffer:</b>	10 mM Tris-Cl, pH 7.6 0.03 % (w/v) Bromphenolblau 60 % (w/v) Glycerol 60 mM EDTA

### 2.2.1.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Nach der elektrophoretischen Trennung der DNA und Sichtbarmachung mit Ethidiumbromid wurde die entsprechende Bande unter UV-Licht mit Hilfe eines Skalpells ausgeschnitten und anschließend mittels des *Nucleo Spin Gel and PCR clean-up-Kits* von Macherey und Nagel entsprechend der Angaben des Herstellers extrahiert.

### 2.2.1.4 DNA-Ligation

Bei einer Ligationsreaktion verknüpfen als Ligasen bezeichnete Enzyme ATP-abhängig die freien 3'-OH-Enden der DNA mit den 5'-Phosphatenden. Dadurch können komplementäre DNA-Fragmente kovalent miteinander verbunden und neue, rekombinante Plasmide erzeugt werden. Der Ligationsansatz wurde entweder eine Stunde bei 21 °C oder über Nacht bei 14 °C inkubiert. Je nach Anzahl der zu ligierenden DNA-Fragmente betrug das Reaktionsvolumen 10 bis 30 µl. Schließlich wurden 5 bis 10 µl des Ligationsansatzes zur Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen verwendet (Kap. 2.2.2.4)



Reaktionsansatz:

linearisierte Vektor-DNA	0,2 µg
Insert-DNA	0,5-1 µg
T4 DNA-Ligase	1 U/µg DNA
10 x Ligase-Puffer	1-3 µl
H <sub>2</sub> O	ad 10-30 µl

**2.2.1.5 Identifizierung transformanter Zellen mittels PCR („Colony Screen“)**

Zur Identifizierung transformierter Bakterienzellen wurde eine PCR durchgeführt. Dafür wurden von den kultivierten LB-Agar-Platten einzelne Kolonien in je 30 µl Wasser resuspendiert und davon 10 µl als Matrize für die PCR eingesetzt. Je nach Transgen oder Plasmid wurden die entsprechenden Primerpaare zur Amplifikation bestimmter Sequenzbereiche und somit zur Detektion des aufgenommenen Plasmids verwendet. Annealingtemperatur und Elongationszeit des PCR-Programms wurden in Abhängigkeit der verwendeten Primer und des zu amplifizierenden Sequenzbereiches entsprechend variiert.

PCR-Ansatz:

Bakteriensuspension	10.0 µl
10 x Reaktionspuffer	2.0 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.6 µl
25 mM dNTP-Mix	1.6 µl
10 mM Primer <i>forward</i>	0.2 µl
10 mM Primer <i>reverse</i>	0.2 µl
Taq-Polymerase	1-2 Units
H <sub>2</sub> O	ad 20.0 µl

**10 x Reaktionspuffer:**

100 mM Tris-Cl, pH 8.8
500 mM KCl
0.8 % (v/v) Triton X-100

Zeit-Temperatur-Programm:

Denaturierung	5 min	94 °C	
Denaturierung	30 s	94 °C	
Annealing	30 s	55 °C	30 Zyklen
Elongation	1 min	72 °C	
Finale Elongation	5 min	72 °C	

Nach Identifizierung eines positiven Klon wurden die verbliebenen 20 µl der Zellsuspension zur Inokulation flüssigen LB-Mediums, versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum, verwendet und die Kultur über Nacht im Wärmeschrank schüttelnd inkubiert.

### 2.2.1.6 Plasmid-Isolierung (Plasmid Mini-Präparation)

Die Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979).

Hierfür wurden 1.5 ml (*high-copy plasmid*) bzw. 3 ml (*low-copy plasmid*) einer *E. coli*-Übernachtskultur bei 10 000 rpm eine Minute pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 200 µl Lösung I durch vortexen resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl alkalischer Lösung II erfolgten nach kurzer Inkubation bei RT die Lyse der Zellen und die vollständige Denaturierung der DNA. Durch die anschließende Zugabe von 200 µl Lösung III wurde der Ansatz neutralisiert, wobei die Plasmid-DNA wieder renaturiert und in Lösung geht. Die präzipitierte chromosomale DNA und die als Kalium-Dodecylsulfat-Flocken präzipitierten bakteriellen Proteine wurden durch Zentrifugation (16400 rpm, 5 min, RT) abgetrennt. Der Überstand mit der gelösten Plasmid-DNA wurde abgenommen und in ein frisches Reagiergefäß überführt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit 600 µl Isopropanol (100 %) gefällt und abzentrifugiert (16400 rpm, 15 min, RT). Der Überstand wurde verworfen und das Plasmid-DNA-Pellet mit 1 ml Ethanol (75 % (v/v)) gewaschen. Nach der Trocknung des Pellets bei RT wurde die Plasmid-DNA in 25 µl H<sub>2</sub>O gelöst und auf Eis bzw. bei -20 °C gelagert.

Größere Mengen Plasmid-DNA oder Plasmid-DNA höherer Reinheit wurden mit Hilfe des *PureLink™ HiPure Plasmid Purification-Kits* von Invitrogen entsprechend der Angaben des Herstellers gewonnen.

**Lösung I:** 50 mM Glucose  
25 mM Tris-Cl, pH 8.0  
10 mM EDTA  
100 µg/ml RNase

**Lösung II:** 0.2 M NaOH  
1 % (w/v) SDS

**Lösung III:** 3 M Kaliumacetat, pH 4.8

### 2.2.1.7 Restriktionsverdau

Bakterielle Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die spezifische DNA-Sequenzmotive aus 4 bis 10 Basenpaaren erkennen und entweder direkt am Erkennungsmotiv oder mit Abstand von wenigen Basenpaaren die Phosphatbindungen im Rückgrat der DNA hydrolysieren. Auf diese Weise können gezielt einzelne Sequenzbereiche aus der DNA gelöst und isoliert werden. Die bei einem solchem Restriktionsverdau entstehenden Enden sind entweder glatt (sogenannte blunt ends) oder überhängend (sogenannte sticky ends) und besitzen eine hohe Affinität zueinander. Daher können bei einer anschließenden Ligationsreaktion (Kap. 2.2.1.4) zueinander komplementäre Enden wieder verknüpft werden und dadurch beispielsweise gewünschte Gensegmente in die entsprechenden Plasmide eingebracht werden.

Der Restriktionsverdau von DNA erfolgte mit den entsprechenden Restriktionsenzymen in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer. Dabei wurden 1 bis 10 µg DNA mit 1 bis 2 Units Enzym pro µg DNA im Temperaturoptimum des verwendeten Enzyms für 1 bis 2 Stunden inkubiert. Bei einer sequentiellen Spaltung mit 2 verschiedenen Restriktionsendonukleasen wurde das zuerst verwendete Enzym vor der Zugabe des zweiten Enzyms bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inaktiviert. Zur Entfernung von RNA konnte dem Ansatz RNase zugefügt werden. Der Restriktionsverdau wurde anschließend elektrophoretisch auf einem Agarosegel aufgetrennt und gegebenenfalls einzelne DNA-Segmente extrahiert.

Reaktionsansatz:

DNA	1-10 µg
Restriktionsenzym	1-2 U/µg
10 x Reaktionspuffer	1 µl
RNase	1 µl
H <sub>2</sub> O	ad 10 µl

#### 2.2.1.8 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Die Konzentration einer RNA- oder DNA-Probe wurde photometrisch mittels der *Nano Quant Plate* am INFINITE M200 der Firma *Tecan* oder mit dem NanoDrop® ND-1000 Spektralphotometer der Firma *Peqlab* entsprechend den Angaben des Herstellers bestimmt.

#### 2.2.1.9 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Bestimmung der Nukleotidsequenz erfolgte nach Auftrag durch die Firma *Qiagen* (Hilden) oder die Firma *Seqlab*.

### 2.2.2 Methoden zur Arbeit mit Bakterien

#### 2.2.2.1 Herstellung der verwendeten Nährmedien

Zur Herstellung der benötigten Nährmedien für die Bakterienzellkultur (Kap. 2.1.5.1) wurden die festen Bestandteile abgewogen, die flüssigen Komponenten zugegeben und nach der Addition von Wasser bis zum Endvolumen der entsprechende pH-Wert eingestellt. Anschließend wurde der Ansatz bei 121°C 20 Minuten dampfsterilisiert. Für die Herstellung von Nähragarplatten wurden nach dem Abkühlen auf ca. 60°C die entsprechenden Antibiotika in der jeweils erforderlichen Konzentration zugegeben und das Medium zum Aushärten in sterile Petrischalen gegossen. Die fertigen Nähragarplatten wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Flüssiges Nährmedium wurde bis zur Verwendung bei RT gelagert und erst direkt vor Gebrauch mit den entsprechenden Antibiotika versetzt.

### 2.2.2.2 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Durch die Behandlung von Bakterienzellen mit  $\text{CaCl}_2$  und  $\text{RbCl}$  kann durch Modifikationen der Bakterienzellwand die Aufnahme von DNA durch die Bakterien erleichtert werden. Dazu wurden als Vorkultur 3 ml LB-Medium mit *E. coli*-Zellen inokuliert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit 1 ml dieser Vorkultur wurden 100 ml LB-Medium angeimpft und bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,5 (logarithmische Wachstumsphase) bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden zunächst für 10 min auf Eis gekühlt und anschließend durch Zentrifugation bei 3000 g für 10 min bei 4°C geerntet. Das Zellpellet wurde vorsichtig in 15 ml eiskaltem TfB1-Puffer resuspendiert und 90 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde wiederum 10 min bei 3000 g, 4°C zentrifugiert und das Zellpellet in 4 ml eiskaltem TfB2-Puffer aufgenommen. Der Ansatz wurde in Aliquots zu je 50 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

<b>TfB1-Puffer:</b>	100 mM $\text{RbCl}$ ;	<b>TfB2-Puffer:</b>	10 mM MOPS
	50 mM $\text{MnCl}_2$		10 mM $\text{RbCl}$
	30 mM KOAc		75 mM $\text{CaCl}_2$
	10 mM $\text{CaCl}_2$		15% (w/v) Glycerin
	15% (w/v) Glycerin		pH 6.8 mit KOH
	pH 5.8		

### 2.2.2.3 Herstellung kompetenter *A. tumefaciens*-Zellen

Die Herstellung kompetenter *A. tumefaciens*-Zellen erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Höfgen und Willmitzer (1988).

Zur Gewinnung kompetenter Zellen wurden zunächst als Vorkultur 3 ml LB-Medium mit *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen inokuliert und über Nacht bei 28°C kultiviert. Von dieser Vorkultur wurde 1 ml zum Beimpfen von 100 ml LB-Medium verwendet. Diese Kultur wurde bei 28°C zwei bis vier Stunden schüttelnd inkubiert und anschließend zu je 50 ml bei 5000 rpm und 4°C 20 Minuten pelletiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml eiskaltem TE-Puffer resuspendiert und 10 Minuten bei 5000 rpm, 4°C zentrifugiert. Schließlich wurden die Zellen in 10 ml LB-Medium aufgenommen, zu je 300 µl aliquotiert in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

<b>TE-Puffer:</b>	10 mM Tris-Cl
	1 mM EDTA
	pH 7.4

### 2.2.2.4 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Propagation und Expression von Plasmiden müssen diese in Bakterienzellen eingeschleust werden. Zur Transformation der Bakterienzellen wurden daher 50 µl bereits kompetenter *E. coli* mit Plasmid-DNA oder 5 bis 10 µl des Ligationsansatzes versetzt und 20 Minuten auf Eis

inkubiert. Durch einen anschließenden Hitzeschock bei 42°C für 60 Sekunden erfolgte die Aufnahme des Plasmids. Nach kurzer Abkühlung auf Eis wurden die Zellen mit 500 µl LB-Medium versetzt und 60 Minuten bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die transformierten Zellen wurden schließlich auf LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausgebracht und über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank kultiviert.

#### **2.2.2.5 Transformation kompetenter *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen**

Die Transformation kompetenter *Agrobacterium*-Zellen erfolgte ebenfalls in Anlehnung an das Protokoll von Höfgen und Willmitzer (Hofgen & Willmitzer, 1988). Zur Transformation wurden 100 µl bereits kompetente Zellen von *Agrobacterium tumefaciens* mit 1 bis 5 µl einer Plasmid-Präparation aus *E. coli* versetzt und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer sich anschließenden Inkubation in flüssigem Stickstoff für weitere 5 Minuten erfolgte die Aufnahme des Plasmids durch eine 5-minütige Inkubation bei 37°C. Die Zellen wurden kurz auf Eis abgekühlt, mit 500 µl LB-Medium versetzt und bei 28°C 2 bis 4 Stunden schüttelnd inkubiert. Schließlich wurden die transformierten Bakterienzellen auf LB-Agar-Platten mit Rifampicin, Gentamicin und Carbenicillin bzw. Kanamycin ausgebracht und 2 bis 5 Tage bei 28°C im Wärmeschrank kultiviert. Die erhaltenen Kolonien wurden mittels PCR (Kap. 2.2.1.5) auf den Transformationserfolg hin überprüft und positive Klone in Rifampicin-, Gentamicin- und Carbenicillin- bzw. Kanamycin-haltigem LB-Medium kultiviert. Diese konnten zur Infiltration von *N. benthamiana* verwendet werden.

#### **2.2.2.6 Bestimmung der Optischen Dichte von Bakterienkulturen**

Die Optische Dichte von Zellkulturen wurde photometrisch am INFINITE M200 der Firma Tecan entsprechend den Angaben des Herstellers bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt (OD<sub>600</sub>). Dazu wurde 1 ml der zu untersuchenden Bakterienkultur in einer Küvette gegen das entsprechende Kultur-Medium vermessen.

#### **2.2.2.7 Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung von Bakterien**

Die Zellen wurden auf Agarplatten oder als Suspensionskultur in LB-Medium (Maniatis *et al.*, 1989) kultiviert. Um auf einzelne Mutationen der verwendeten Stämme oder Antibiotika-Resistenz vermittelnde Plasmide zu selektieren, wurden dem Medium nach dem Autoklavieren sterilfiltrierte Antibiotika-Lösungen bis zur erforderlichen Endkonzentration zugesetzt.

Die Flüssigkulturen wurden in Kulturröhrchen oder Erlenmeyerkolben bei 20 bis 37°C auf einem Schüttler bei 80 bis 300 Upm geschüttelt. Falls erforderlich wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 8000 g, 4°C geerntet und bei -20°C gelagert oder ein Teil der Kultur mit frischem Medium versetzt im Kühlschrank für spätere Analysen aufbewahrt. LB-Platten wurden über Nacht bei 20 bis 37°C inkubiert und anschließend bei 4°C gelagert. Alle sieben bis 14 Tage wurden die Zellen auf frische Platten überimpft. Die Lagerung der Bakterien über längere Zeiträume (≥ 2 Monate)

erfolgte in glycerolhaltigem Medium bei -80 °C. Dazu wurden 300 µl einer Bakterienkultur mit 500 µl 50 %-igem (v/v) Glycerin gemischt und bei -80 °C gelagert.

#### **2.2.2.8 Induktion der Proteinexpression mittels IPTG**

Eine je nach Anwendung ausreichende Menge LB-Medium versetzt mit den entsprechenden Antibiotika wurde mit einer *E. coli*-Kultur inokuliert und 2 bis 6 Stunden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.5 bis 1.0 kultiviert. Vor der IPTG-Zugabe wurde gegebenenfalls 1 ml Kultur entnommen, durch Zentrifugation sedimentiert und der Überstand vollständig abgenommen. Das Pellet wurde in 100 µl 2 x SDS-Probenpuffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Weiterhin wurden vor der Induktion einige Milliliter Kultur abgenommen, um als uninduzierte Kontrolle analog der induzierten Kultur behandelt zu werden. Anschließend wurde die Kultur mit 1 mM IPTG versetzt und bei 20 °C 6 bis 14 h weiter kultiviert. Nach dieser Zeit wurde von der induzierten und uninduzierten Kultur je 1 ml entnommen, durch Zentrifugation sedimentiert und der Überstand vollständig abgenommen. Das Pellet wurde in 100 µl 2 x SDS-Probenpuffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation bei 8000 x g und 4 °C für 10 Minuten geerntet, das Pellet mit 20 mM Tris-Puffer gewaschen und bis zur weiteren Aufarbeitung zur Proteinextraktion bei -20 °C oder -80 °C gelagert. Die zuvor entnommenen Proben wurden gegebenenfalls im Vorfeld der Reinigung mittels SDS-PAGE elektrophoretisch analysiert.

### **2.2.3 Methoden zur Arbeit mit pflanzlichem Material**

#### **2.2.3.1 Herstellung der verwendeten Nährmedien**

Zur Herstellung der benötigten Nährmedien für die Pflanzenzellkultur (Kap. 2.1.5.2) wurden die festen Bestandteile abgewogen, die flüssigen Komponenten zugegeben und nach der Addition von Wasser bis zum Endvolumen der entsprechende pH-Wert eingestellt. Anschließend wurde der Ansatz bei 121 °C 20 Minuten dampfsterilisiert. Für die Herstellung von Phytoagarplatten, -boxen oder -gläsern wurden nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C die entsprechenden Antibiotika in der jeweils erforderlichen Konzentration zugegeben und das Medium zum Aushärten in die sterilen Gefäße gegossen. Das fertige Medium wurde bis zum Gebrauch bei RT gelagert.

#### **2.2.3.2 Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung von Pflanzen**

Die verwendeten Pflanzen wurden in den Gewächshäusern des Institutes für Botanik bei Temperaturen zwischen 16 und 24 °C und einer Beleuchtungszeit von 8 bis 16 Stunden kultiviert. Die relative Luftfeuchtigkeit betrug ca. 60 bis 70 %.

Die Kultivierung von Pflanzen unter sterilen Bedingungen erfolgte in der Zellkulturkammer bei einer konstanten Temperatur von 26 °C unter Dauerlicht. Nach der unter sterilen Bedingungen erfolgten Selektion wurden die transgenen Linien auf Erde ausgebracht und anschließend bis zur

Samenreife im Gewächshaus bei einer durchschnittlichen Temperatur von 22°C weiter kultiviert. Zur Erhöhung der Luftfeuchtigkeit wurden die Pflanzen aus der Sterilkultur an den ersten Tagen auf Erde unter einer lichtdurchlässigen Haube kultiviert. Die reifen Samen der einzelnen Linien wurden schließlich geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Infiltrierte Pflanzen von *Nicotiana benthamiana* wurden bis zur Ernte des Blattmaterials nach durchschnittlich 7 Tagen in der Zellkulturkammer bei einer Temperatur von 22°C und einer Beleuchtungszeit von etwa 14 Stunden weiter kultiviert.

#### 2.2.3.3 Sterilisation von Samen

Zur Erzeugung steriler Pflanzen oder zur anschließenden Embryoexplantation wurden die Samen zur Oberflächensterilisation 20 Minuten in Sterilisationslösung schüttelnd inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und der Samen fünf Mal mit je 1 ml sterilem Wasser gewaschen, um Reste von Natriumhypochlorit und Tween 20 zu entfernen. Nachfolgend konnten die Samen zu sterilen Anwendungen weiterverwendet werden.

**Sterilisationslösung:**      5.25 % (v/v) Natriumhypochlorit  
                                     1 % (v/v) Tween 20  
                                     in sterilem H<sub>2</sub>O

#### 2.2.3.4 *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation von Pflanzen

Das pflanzenpathogene Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens* kann man sich bei der Herstellung transgener Pflanzen zunutze machen, da es in der Lage ist, die Wirtspflanze genetisch zu manipulieren. Es befällt die Wirtspflanze an Verwundungsstellen und ruft dort durch das Umprogrammieren des pflanzlichen Zellstoffwechsels die Bildung bestimmter Phytohormone (Cytokinin, Auxin) hervor, die ein unkontrolliertes Zellwachstum und damit die Bildung so genannter Wurzelhalsgallen auslösen. Gleichzeitig wird die Wirtspflanze zur Bildung von Opinen angeregt, die dem Bakterium als Stickstoffquelle dienen.

In der Natur wird dieses Umprogrammieren des pflanzlichen Stoffwechsels durch so genannte Tumor-induzierende Plasmide (Ti-Plasmide) von *Agrobacterium* ermöglicht. Hier liegen die Onkogene, Gene für den Opin-Katabolismus und solche für den Transfer der so genannten T-DNA (Transfer-DNA). Dies ist der DNA-Abschnitt, der in die Pflanze übertragen wird. Die T-DNA wird von zwei Sequenzbereichen flankiert, die die Erkennungssequenz für die Mobilisierung der T-DNA darstellen (*Right- und Left-Border, RB und LB*). Nach der Übertragung wird die T-DNA in das pflanzliche Genom integriert. Die so genannten *vir*-Gene, die für die Erkennung der Verwundungsstelle und die Anheftung an die Pflanzenzelle verantwortlich sind, befinden sich auf der chromosomalen DNA von *Agrobacterium*.

In der pflanzlichen Gentechnik arbeitet man mit modifizierten Plasmiden, die zur Selektion zusätzlich Resistenz gegen Antibiotika vermitteln. Zudem wird mit binären Vektorsystemen gearbeitet, bei denen die Funktionen des Ti-Plasmids auf zwei Plasmide verteilt sind. Daher trägt

der Laborstamm von *Agrobacterium* das größere der beiden Plasmide mit der *vir*-Region und enthält meist auch chromosomal eine Antibiotikum-Resistenz. Das kleinere Plasmid enthält zwischen *RB* und *LB* die T-DNA mit einer MCS zur Insertion gewünschter DNA-Segmente sowie ein Resistenzgen zur Selektion. Außerhalb der T-DNA liegt zudem ein Markergen zur Selektion in *E. coli* (Lacroix *et al.*, 2006; Tzfira & Citovsky, 2006).

Transgene Pflanzen können mit verschiedenen Methoden und unterschiedlichem Transformationserfolg generiert werden. So können zum Beispiel Blattgewebestücke oder Protoplasten mit einer Agrobakterien-Suspension infiziert und unter Selektionsdruck und durch die Verwendung geeigneter Phytohormone transgene Pflanzen regeneriert werden.

#### **2.2.3.4.1 Transiente Expression in *Nicotiana benthamiana***

Das in dieser Arbeit eingesetzte System der Firma *ICON Genetics* (Halle/Saale) zur transienten Expression von Proteinen in *Nicotiana benthamiana* beruht auf der Verwendung viraler Pro-Vektor-Module, die durch *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer in die Pflanzenzelle eingeschleust werden. Dort werden die Module zu einem transkribierbaren Amplikon kombiniert (Kap. 1.5.1).

Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Marillonnet (Marillonnet *et al.*, 2004; Marillonnet *et al.*, 2005). Dazu wurden zur Infiltration von etwa 8 Wochen alten *N. benthamiana*-Pflanzen je Modul je 10 ml einer Agrobakterien-Übernachtskultur, kodierend also für 3'-Provektor-Modul mit zu exprimierender Gensequenz, für 5'-Provektor-Modul und für die Rekombinase, bei 6000 rpm 10 Minuten pelletiert. Die Pellets wurden jeweils in 50 ml *ICON*-Puffer resuspendiert und die Bakteriensuspensionen der einzelnen Module anschließend zu je gleichen Teilen gemischt. Diese Suspension wurde schließlich zur Infiltration der Pflanzen verwendet. Die Infiltration erfolgte mittels einer Spritze in die Stomata auf der Blattunterseite. Die Funktionskontrolle erfolgte über gleichzeitige Infiltration des Plasmids pICH7410 (Kap. 2.1.8)

Die Proteinakkumulation konnte nach fünf bis zehn Tagen durch die Eigenfluoreszenz des akkumulierten Proteins oder durch Immunodetektion mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Die Blätter wurden anschließend zur Ernte in flüssigem Stickstoff schockgefroren, mit Mörser und Pistill pulverisiert und bei -20°C oder -80°C bis zur weiteren Verwendung des Materials gelagert.

**ICON-Puffer:**      10 mM MES  
                         10 mM MgSO<sub>4</sub>

#### **2.2.3.4.2 Stabile Transformation von *R. communis* mittels *A. tumefaciens***

Die Transformation von *R. communis* erfolgte mit wenigen Modifikationen in Anlehnung an das Protokoll von Sujatha und Sailaja (2005).

Dabei wurden die reifen Samen von *Ricinus communis* über Nacht in Wasser vorgequollen, geschält und durch Inkubation in 5.25 %-iger Natriumhypochloritlösung für 20 Minuten sterilisiert.



Anschließend wurden die Samen fünf Mal mit sterilem Wasser gewaschen. Aus den Samen wurden schließlich unter sterilen Bedingungen vorsichtig die Embryos präpariert, wobei die Kotyledonenansätze entfernt wurden. Die Embryos wurden nachfolgend fünf bis sieben Tage auf MS-Medium versetzt mit 0.1 mg/l BAP kultiviert und nach dieser Zeit mit *A. tumefaciens* unter Anlegen eines Vacuums infiziert. Dazu wurden 50 ml LB-Medium versetzt mit 50 µg/ml Rifampicin, 15 µg/ml Gentamycin und 50 µg/ml Kanamycin mit 3 ml einer Übernachtskultur inokuliert und über Nacht weiter kultiviert. Die Zellen wurden schließlich bei 5000 rpm pelletiert und in LB- oder hormonfreiem MS-Medium resuspendiert, wobei verschiedene Verdünnungen erzeugt wurden, um variable Zelldichten zu erzielen ( $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $4 \times 10^8$ ,  $8 \times 10^8$  Zellen/ml). Die Explantate wurden vor der Transformation mit einem Skalpell in der meristematischen Region verletzt. Die Ansätze von Radicula und Kotyledonen wurden entfernt. Die prozessierten Embryonen wurden anschließend in die Agrobaktériensuspension getaucht und unter Anlegen eines Vacuums (30 min) inkubiert. Nach dem Abtupfen auf sterilem Filterpapier wurden die transformierten Embryos etwa fünf Tage auf MS-Medium im Dunkeln bei 26 °C kokultiviert. Um ein Überwachsen durch Agrobakterien zu verhindern wurden die Explantate danach 2 Minuten mit einer Cefotaxim-Lösung (250 mg/l) gewaschen und auf MS-Medium überführt, das ebenfalls Cefotaxim in einer Konzentration von 250 mg/l enthielt. Nach 15 Tagen erfolgte der erste von insgesamt drei Selektionszyklen auf MS-Medium, das zusätzlich mit 20 mg/l Hygromycin versetzt war. Nach jeweils weiteren 15 Tagen erfolgte die Selektion auf Medium mit 40 bzw. 60 mg/l Hygromycin (Kap. 2.1.5.2).

**Kultivierung:** MS-Medium + 0.1 mg/l BAP

**Kokultivierung:** MS-Medium

**Kultivierung:** MS-Medium + 0.1 mg/l BAP / 0.5 mg/l TDZ + 250 mg/l Cefotaxim

**Selektion:** MS-Medium + 0.5 mg/l BAP + 250 mg/l Cefotaxim  
+ 20 mg/l Hygromycin (1. Selektionsrunde)  
+ 40 mg/l Hygromycin (2. Selektionsrunde)  
+ 60 mg/l Hygromycin (3. Selektionsrunde)

## 2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.4.1 Extraktion des löslichen Gesamtproteins aus Pflanzenmaterial

Für die Extraktion von Proteinen wurden 100 mg unter flüssigem Stickstoff pulverisiertes Blattmaterial mit 200 µl Proteinextraktionspuffer versetzt und für 30 min schüttelnd auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 20 Minuten bei 4 °C und 16000 x g zentrifugiert. Der wässrige

Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und zur Abtrennung aller zellulären Bestandteile erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Schließlich konnte der Überstand für die Bestimmung des löslichen Gesamtproteins, die SDS-PAGE oder Immunoblot-Analysen verwendet werden.

Sollte der Extrakt später für die Proteinreinigung mittels IMAC verwendet werden, wurde der Ansatz entsprechend vergrößert und 5 bis 10 g pulverisiertes Blattmaterial in einem Puffervolumen bis 100 ml eingesetzt (Verhältnis etwa 1 Teil Blattmaterial zu 10 Teilen Puffer). Der Ansatz wurde 30 Minuten rührend auf Eis inkubiert und zur Entfernung des Blattmaterials vor der Zentrifugation über zwei Lagen Miracloth® filtriert. Als Antioxidans wurde dem Extraktionspuffer 20 mM Natriumascorbat zugegeben. Vor der Auftragung auf die IMAC-Säule wurde der Extrakt gegebenenfalls wiederholt zentrifugiert oder über einen Partikelfilter filtriert, um Schwebeteilchen zu entfernen.

**Proteinextraktionspuffer:** LEW-Puffer  
20 mM Natriumascorbat  
1 mM AEBSF  
optional: 6 mM CHAPS

#### 2.2.4.2 Reinigung des Gesamtproteins aus Blattmaterial

Die Reinigung des Gesamtproteins aus pflanzlichem Material erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Wang *et al.* (2006).

Dabei wurden 200 mg pulverisiertes Blattmaterial mit 1 ml Lösung 1 versetzt, gut gemischt und 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 1 ml Lösung 2 zugegeben, gründlich gemischt und erneut 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen, 1 ml Lösung 3 zugegeben und das Pellet durch Vortexen dispergiert. Anschließend wurde nach wiederholter Zentrifugation der Überstand vollständig abgenommen, verworfen und das Pellet getrocknet. Schließlich wurde 1 ml Lösung 4 zugegeben, gemischt und nach kurzer Inkubation 3 Minuten zentrifugiert. Die Phenolphase wurde in ein neues Gefäß überführt, mit 1 ml Lösung 5 versetzt und zur Präzipitation der Proteine über Nacht bei -20°C inkubiert. Durch Zentrifugation wurde ein weißes Pellet erhalten, das zunächst mit Methanol, anschließend mit 80 % (v/v) Aceton gewaschen wurde. Das Protein-Pellet wurde schließlich getrocknet, in einem geeigneten Puffer aufgenommen und stand anschließend für proteinbiochemische Analysen zur Verfügung oder wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 14000 x g bei 4°C.

**Lösung 1:** Aceton  
10 % (w/v) TCA

**Lösung 2:** 80 % (v/v) Methanol  
0.1 M Ammoniumacetat

**Lösung 3:** 80 % (v/v) Aceton

**Lösung 4:** 50 % (v/v) Phenol pH 8.0  
50 % (v/v) SDS-Puffer

SDS-Puffer: 30 % (w/v) Saccharose  
2 % (w/v) SDS  
0.1 M Tris-Cl, pH 8.0  
5 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol

**Lösung 5:** Methanol  
0.1 M Ammoniumacetat

#### 2.2.4.3 Reinigung von rekombinanten Proteinen aus Blattmaterial mittels IMAC (Profinia™ Protein Purification System)

Zur Reinigung der in *N. benthamiana* exprimierten Proteine wurde die native *Immobilized Metal Affinity Chromatography* (IMAC) angewandt. Dabei komplexieren hier die rekombinanten, mit Hexa-Histidin-Resten fusionierten Proteine mit den Nickelionen des Trägermaterials der Chromatographie-Säulen. Dieser Komplex kann nach dem Auswaschen ungebundener Proteine durch die Zugabe eines Kompetitors (Imidazol) aufgehoben und das rekombinante Protein eluiert werden.

Zur Reinigung des rekombinanten Proteins aus Blattmaterial wurde ein Rohextrakt wie unter 2.2.4.1 beschrieben hergestellt. Dieser wurde ausreichend lange zentrifugiert oder filtriert (Partikelfilter, Durchmesser 0.45  $\mu$ m), um Partikelfreiheit zu gewährleisten. Anschließend wurde der Extrakt mittels des *Profinia™ Protein Purification System* der Firma *BioRad* entsprechend der Angaben des Herstellers aufgereinigt und das rekombinante Protein isoliert und entsalzt. Dabei wurden Bio-Scale Mini Profinity IMAC-Säulen (1 ml, Ni-beladen, 40 mm x 5.6 mm, max. 45 psi) und Bio-Scale Mini Bio-Gel P-6 Desalting-Säulen (10 ml, Gelfiltrationssäule, 80 mm x 12.6 mm, max. 45 psi) verwendet. Wenn nicht anders angegeben wurde bei einer Flussrate von 2 ml pro Minute gearbeitet. Dabei wurden die Leitfähigkeit und die UV-Absorption verfolgt und die Daten anhand der *Profinia™* Software aufgearbeitet.

Die erhaltenen Fraktionen bestehend aus Durchfluss, Waschphase 1 und Waschphase 2 sowie Eluat wurden in Falcon-Röhrchen aufgefangen und für die spätere Analyse auf Eis bzw. in Aliquots von 20  $\mu$ l bei -20°C gelagert. Die Analyse der Proteinreinigung erfolgte mittels SDS-PAGE (Kap. 2.2.4.7) mit anschließender Coomassie-Färbung (Kap. 2.2.4.9) oder Immunodetektion des isolierten Proteins unter Verwendung spezifischer Antikörper (Kap. 2.2.4.11).

#### 2.2.4.4 Extraktion der löslichen Proteine aus *E. coli*-Zellen

Um das rekombinante Protein im Cytoplasma der Zellen für eine Proteinreinigung z. B. mittels IMAC zugänglich zu machen, müssen die Bakterienzellen zunächst aufgeschlossen werden. Dazu wurden die Zellen wie unter Kapitel 2.2.2.7 beschrieben gewonnen, im 10-fachen (w/v) Volumen Lysispuffer aufgenommen und mit 1 mg Lysozym pro ml Bakteriensuspension zum Abbau des Peptidoglycan-Gerüsts der Zellwand 30 Minuten schüttelnd auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 1 mM AEBSF und gegebenenfalls 6 mM CHAPS sowie DNase I zugesetzt. Schließlich wurde der Ansatz versetzt mit einer ausreichenden Menge Quarzsand fünfmal für je 60 Sekunden gevortext, wobei zwischen den Intervallen ebenso lange auf Eis gekühlt wurde. Alternativ wurde die Bakteriensuspension zum Aufschluss der Zellen sonifiziert, wobei fünf Pulse mit 25 % Leistung in Intervallen von je 30 Sekunden durchgeführt wurden und zwischendurch auf Eis gekühlt wurde. Beide Methoden unterschieden sich hinsichtlich ihrer Lyseeffizienz kaum. Zur Klärung des Lysates und Abtrennung unlöslicher Bestandteile wurde anschließend bei 4 °C mit 16000 x g 20 Minuten zentrifugiert, wobei dieser Schritt gegebenenfalls wiederholt oder das Lysat über einen Partikelfilter filtriert wurde, um vor der Reinigung mittels IMAC die Partikelfreiheit des Lysates zu gewährleisten.

**Lysispuffer:** LEW-Puffer  
1 mg/ml Lysozym  
1 mM AEBSF  
optional: 6 mM CHAPS  
DNase I

#### 2.2.4.5 Reinigung von rekombinanten Proteinen aus *E. coli*-Zellkultur mittels IMAC (Profinia™ Protein Purification System)

Die Reinigung der bakteriell exprimierten Proteine erfolgte ebenfalls mittels nativer *Immobilized Metal Affinity Chromatography* (IMAC; vergleiche auch 2.2.4.3).

Zur Reinigung des rekombinanten Proteins aus *E. coli* wurden die Zellen wie unter 2.2.2.7 beschrieben gewonnen und wie unter 2.2.4.4 beschrieben aufgeschlossen. Das Lysat wurde ausreichend lange zentrifugiert oder filtriert (Partikelfilter, 0.45 µm), um Partikelfreiheit zu gewährleisten. Schließlich wurde aus dem Lysat mittels des *Profinia™ Protein Purification Systems* der Firma *BioRad* entsprechend der Angaben des Herstellers das rekombinante Protein isoliert und gleichzeitig entsalzt. Dabei wurden Bio-Scale Mini Profinity IMAC-Säulen (1 ml, Ni-beladen, 40 mm x 5.6 mm, max. 45 psi) und Bio-Scale Mini Bio-Gel P-6 Desalting-Säulen (10 ml, Gelfiltrationssäule, 80 mm x 12.6 mm, max. 45 psi) verwendet. Wenn nicht anders angegeben wurde bei einer Flussrate von 2 ml pro Minute gearbeitet. Dabei wurden die Leitfähigkeit und die UV-Absorption verfolgt und die Daten anhand der Profinia™ Software aufgearbeitet.

Die erhaltenen Fraktionen bestehend aus Durchfluss, Waschphase 1 und Waschphase 2 sowie Eluat wurden in Falcon-Röhrchen aufgefangen und für die spätere Analyse auf Eis bzw. in

Aliquots von 20 µl bei -20°C gelagert. Die Analyse der Proteinreinigung erfolgte mittels SDS-PAGE (Kap. 2.2.4.7) mit anschließender Coomassie-Färbung (Kap. 2.2.4.9) oder Immunodetektion des isolierten Proteins unter Verwendung spezifischer Antikörper (Kap. 2.2.4.11).

#### 2.2.4.6 Quantifizierung von Proteinen

Die Quantifizierung von Proteinen oder die Bestimmung des löslichen Gesamtproteingehalts erfolgte mit dem *BCA Protein Assay*-Kit von Pierce entsprechend der Angaben des Herstellers. Diese Methode der Proteinbestimmung basiert auf der Biuret-Reaktion, bei der im Alkalischen in Anwesenheit von Proteinen  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen reduziert werden, die mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure (BCA) einen Chelat-Komplex bilden. Dessen Absorption bei 562 nm ist daher ein direktes Maß für die Proteinkonzentration in der Probe.

Die Proben wurden gegebenenfalls entsprechend verdünnt und die Proteinkonzentration in Mikrotiterplatten photometrisch bei 562 nm anhand einer mit BSA erstellten Kalibriergeraden ermittelt, wobei jeweils Dreifach-Bestimmungen durchgeführt wurden.

Wurden Proteine aus Pflanzen- oder Bakterienlysaten mittels *Profinia*-System der Firma *BioRad* aufgereinigt, so erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration im Eluat außerdem durch den im Gerät vorhandenen UV-Detektor. Dieser Wert konnte durch eine photometrische Messung am NanoDrop®ND-1000 Spektralphotometer bei 280 nm oder mittels BCA-Assay überprüft werden.

#### 2.2.4.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels SDS-PAGE können Proteinlösungen analysiert und Aussagen bezüglich ihrer Reinheit, des Molekulargewichts sowie gegebenenfalls der Homogenität der enthaltenen Proteine getroffen werden. Dabei durchlaufen die Proteingemische eine feinporige Polyacrylamid-Matrix, die durch die Polymerisation der beiden monomeren Bestandteile Acrylamid und Bisacrylamid unter Anwesenheit freier Radikale entsteht. Die Porengröße und damit die Trennleistung des Gels werden durch das Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid bestimmt (Maniatis *et al.*, 1989) und in Abhängigkeit von der Molekülgröße der zu trennenden Proteine gewählt. Gleichzeitig wird durch die Zugabe des anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) und ein Erhitzen der zu analysierenden Proteinprobe bewirkt, dass sich Quartär-, Tertiär- und Sekundärstrukturen lösen, wobei sich die Anlagerung von SDS proportional zur Größe der Proteine verhält. Dadurch wird die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine durch die Polyacrylamid-Matrix allein von ihrem Molekulargewicht bestimmt, da die Ladung mit der Molekülgröße zunimmt, und eine Trennung der Polypeptide durch Anlegen einer Spannung ermöglicht. Durch die Addition von reduzierenden Thiolverbindungen zum Probenpuffer können zudem Disulfidbrückenbindungen gespalten und so Proteinkomplexe in ihre monomeren Bestandteile zerlegt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die denaturierende, diskontinuierliche SDS-PAGE nach der Methode von Lämmli (Laemmli, 1970) mit Tris-Glycin Puffern. Je nach Molekulargewicht der zu analysierenden Proteine wurden 12.5 bis 18 %-ige Trenngele verwendet und gegebenenfalls bis

zur Verwendung unter Trenngelüberschichtungspuffer bei 4 °C gelagert. Das Sammelgel wurde am Tag der Elektrophorese über das Trenngel gegossen und etwa 30 Minuten aushärten gelassen. Schließlich wurden 20 µl Proteinlösung mit 5 µl 5 x SDS-Probenpuffer gemischt und 10 Minuten bei 95 °C erhitzt. Von diesem Ansatz wurden 1-20 µl für die Elektrophorese verwendet. Sollten Pflanzenproben direkt untersucht werden wurden etwa 100 mg pulverisiertes Blattmaterial mit 200 µl 2 x SDS-Probenpuffer versetzt, 10 Minuten bei 95 °C erhitzt und anschließend zur Abtrennung der zellulären Bestandteile 5 Minuten bei 16400 rpm zentrifugiert. Vom Überstand wurden ebenfalls 1-20 µl für die Elektrophorese eingesetzt. Das Zellpellet von 1 ml einer Bakterienkultur wurde in 100 µl 2 x SDS-Probenpuffer resuspendiert und 10 Minuten unter gelegentlichem Vortexen bei 95 °C erhitzt. Zur Abtrennung der unlöslichen Bestandteile wurde nachfolgend 5 Minuten bei 16400 rpm zentrifugiert und vom Überstand abermals 1-20 µl für die Elektrophorese verwendet.

Zur Bestimmung der Größe der Proteine wurden zusätzlich 5 µl eines Molekulargewichtstandards (PageRuler™ Prestained Protein Ladder) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte im Gelsystem von Peqlab zunächst für eine Stunde bei einer Spannung von 50 Volt und wurde nach Eintritt der Proben in das Trenngel bei einer angelegten Spannung von 100 Volt fortgesetzt.

Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine entweder im Gel angefärbt oder zur Immunodetektion auf eine PVDF-Membran übertragen.

**12.5 %-iges Trenngel:**      2.4 ml Acrylamidlösung  
   1.4 ml Trenngelpuffer  
   56.3 µl 10 % (w/v) SDS-Lösung  
   1.6 ml H<sub>2</sub>O  
   28.3 µl 10 % (w/v) APS-Lösung  
   25 µl TEMED

**Sammelgel:**                0.44 ml Acrylamidlösung  
   0.83 ml Sammelgelpuffer  
   33 µl 10 % (w/v) SDS-Lösung  
   2.0 ml H<sub>2</sub>O  
   25 µl 10 % (w/v) APS-Lösung  
   25 µl TEMED

**Trenngelpuffer:**            1.5 M Tris-HCl  
   pH 8.8

**Sammelgelpuffer:**        0.5 M Tris-HCl  
   pH 6.8

**Trenngelüberschichtungspuffer:** 0.375 M Tris-HCl  
1 % (w/v) SDS  
pH 8.8

**Laufpuffer:** 25 mM Tris, pH 8.3  
192 mM Glycin,  
0.1 % (w/v) SDS

**SDS-Proben-Puffer:** 50 mM Tris-HCl, pH 6.8  
2 % (w/v) SDS  
0.1 % (w/v) Bromphenolblau  
10 % (v/v) Glycerol  
(10 mM DTT)

#### 2.2.4.8 Bis-Tris Gelelektrophorese

Bis-Tris-Gele sind im Vergleich zu den alkalischen Bedingungen der konventionellen SDS-PAGE sauer. Dies unterdrückt zusätzlich zu dem Probenpuffer zugefügten Reduktionsmitteln die Reoxidation der Proteine und verhindert z. B. die Ausbildung von Disulfidbrückenbindungen. Zudem laufen Proteine niedrigen Molekulargewichts am Ende der Elektrophorese nicht schneller. Dadurch resultiert eine bessere Auflösung von Bis-Tris-Gelen im Vergleich zu konventionellen SDS-PA-Gelen.

Bis-Tris-Gele wurden ursprünglich von Tim Updyke und Sheldon Engelhorn für Invitrogen entwickelt und werden unter dem NuPAGE<sup>®</sup>-Label vertrieben.

Abgesehen von der unterschiedlichen Zusammensetzung der Gele und der Puffer erfolgte die Durchführung analog zu Kapitel 2.2.4.7, wobei das Trenngel mit Wasser überschichtet wurde. Die Elektrophorese erfolgte im Gelsystem von Peqlab bei einer konstanten Spannung von 150 Volt.

**12 %-iges Trenngel:** 2.5 ml 4 x Bis-Tris-Gelpuffer  
4.0 ml Acrylamidlösung  
50 µl 10 % (w/v) APS-Lösung  
3.45 ml H<sub>2</sub>O  
5 µl TEMED

**Sammelgel:** 1.25 ml 4 x Bis-Tris-Gelpuffer  
0.833 ml Acrylamidlösung (30:0.8)  
25 µl 10 % (w/v) APS-Lösung  
2.892 ml H<sub>2</sub>O  
2.5 µl TEMED

---

<b>4 x Bis-Tris-Gelpuffer:</b>	1.5 M Bis-Tris pH 6.5 bis 6.8 mit HCl
<b>5 x Low-MW-Running-Buffer:</b>	250 mM MES 250 mM Tris 5 mM EDTA 0.5 % (w/v) SDS
<b>200 x Running-Buffer Reducing Agent:</b>	1 M Natriumbisulfit

#### 2.2.4.9 Färben von Polyacrylamidgelen mit Coomassie

Eine einfache und schnelle Möglichkeit der Visualisierung der Proteine im Polyacrylamidgel ist die Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blau, das unspezifisch an die basischen und aromatischen Seitenketten der Aminosäuren bindet. Dazu wurde das Gel nach der Elektrophorese kurz in H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend über Nacht unter leichtem Schütteln in der Coomassie-Färbelösung inkubiert. Die Entfärbung des Hintergrundes erfolgte, falls nötig, entweder mit H<sub>2</sub>O oder in einer Lösung aus 50 % (v/v) Ethanol und 10 % (v/v) Essigsäure.

Für ein schnelleres Färbeergebnis wurde das Gel in der Färbelösung mehrmals für einige Sekunden in der Mikrowelle erhitzt, schüttelnd in der warmen Lösung inkubiert und anschließend wie gewohnt entfärbt.

<b>Kolloidale Coomassie-Färbelösung:</b>	0.12 % (w/v) Coomassie G-250 10 % (w/v) (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10 % (v/v) Phosphorsäure 20 % (v/v) Methanol
--	---

#### 2.2.4.10 Färben von Polyacrylamidgelen mit Silbernitrat

Eine sensitivere Methode zur Anfärbung von Proteinen im Polyacrylamidgel ist die Färbung mit Silbernitrat. Dabei komplexieren die Ag<sup>+</sup>-Ionen bestimmte Aminosäurereste der Proteine und werden durch die Anwesenheit von Formaldehyd zu elementarem Silber (Ag<sup>0</sup>) reduziert. Die Nachweisgrenze dieser Färbemethode liegt zwischen 0.5 und 5 ng. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Silberfärbung erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Blum *et al.* (Blum *et al.*, 1987). Dazu wurden die Polyacrylamidgele zunächst für mindestens eine Stunde schüttelnd in Fixierlösung 1 und zweimal 20 Minuten in Fixierlösung 2 inkubiert. Das Gel wurde anschließend 20 Minuten in H<sub>2</sub>O gewaschen, eine Minute in 0.02%iger Natriumthiosulfat-Lösung sensibilisiert und dreimal für je 20 Sekunden mit H<sub>2</sub>O gespült. Schließlich wurden die Gele bei 4 °C 20 Minuten in einer 0.1%igen Silbernitratlösung inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Gele bis zum gewünschten Färbegrad in Entwicklerlösung inkubiert und die Färbung durch 0.05 M EDTA-Lösung gestoppt.



**Fixierlösung 1:** 40 % (v/v) Ethanol  
10 % (v/v) Essigsäure

**Fixierlösung 2:** 30 % (v/v) Ethanol

**Entwicklerlösung:** 3 % (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  
0.05 % (v/v) Formaldehyd

#### 2.2.4.11 Transfer von Proteinen und Immunodetektion (Immunoblot)

Bei einem Immunoblot werden Proteine im elektrischen Feld aus der Polyacrylamidgelmatrix (siehe 2.2.6.7) auf eine PVDF-oder Nylon-Membran transferiert und durch hydrophobe Wechselwirkungen immobilisiert. Daher kann der Immunoblot der spezifischen Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen dienen. Der Nachweis erfolgt über die Bindung spezifischer Antikörper an die entsprechenden Proteine.

Der Transfer der zuvor elektrophoretisch getrennten Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte dabei in der Tank-Blot-Apparatur von Peqlab. Dazu wurde das Gel nach der Elektrophorese 10 Minuten in Transferpuffer equilibriert. Die PVDF-Membran wurde durch kurze Inkubation in Methanol benetzt und anschließend ebenfalls in Transferpuffer equilibriert. Schließlich wurde zwischen Anode und Kathode ein Stapel aus Schaumstoffschwämmchen, Whatmanpapier, Gel und Membran aufgebaut, wobei bezüglich des Aufbaus beachtet wurde, dass die Proteine im elektrischen Feld Richtung Anode wandern. Der Transfer der Proteine wurde in Transferpuffer bei einer Spannung von 100 Volt für die Dauer von einer Stunde durchgeführt.

Nach dem Transfer wurde die Membran zur Maskierung freier Protein-Bindungsstellen über Nacht bei 4 °C mit Blockierungslösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde bei RT mit dem primären Antikörper inkubiert, wobei dieser in einer Verdünnung von 1:200 bis 1:2000 in PBST je nach Angabe des Herstellers eingesetzt wurde. Die Membran wurde danach zunächst dreimal 10 Minuten in PBST gewaschen und schließlich mit dem HRP-konjugierten Sekundär-Antikörper in einer Verdünnung von 1:4000 in PBST inkubiert. Es wurde abermals gewaschen und die Membran zuletzt mit dem Substrat entsprechend der Angabe des Herstellers behandelt (Enhanced Chemiluminescence-HRP Pico Detection Kit von Applichem). Die Detektion des emittierten Lichts erfolgte in der Dunkelkammer auf Röntgenfilmen, die wenige Sekunden bis mehrere Minuten exponiert und dann entwickelt wurden.

**Transferpuffer:** 25 mM Tris  
192 mM Glycin  
20 % (v/v) Methanol

**Blockierungslösung:** 5 % (w/v) Magermilchpulver in PBST

## 2.2.5 Methoden der inhibitorischen Untersuchungen

### 2.2.5.1 Aufzucht von *Anopheles stephensi*-Moskitos

Die Aufzucht von *Anopheles stephensi* erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Looker (Looker & Taylor-Robinson, 2008), das freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Gabriele Pradel, Zentrum für Infektionsforschung (ZINF) der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt wurde. Die Moskitos wurden dabei in einer Kulturkammer bei  $26.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$  und  $80.0 \pm 2.0$  % relativer Luftfeuchtigkeit bei einer Beleuchtungszeit von 12 Stunden in speziellen Käfigen gehalten, die es über einen Gaze-Schal erlauben, innerhalb des Käfigs zu hantieren.

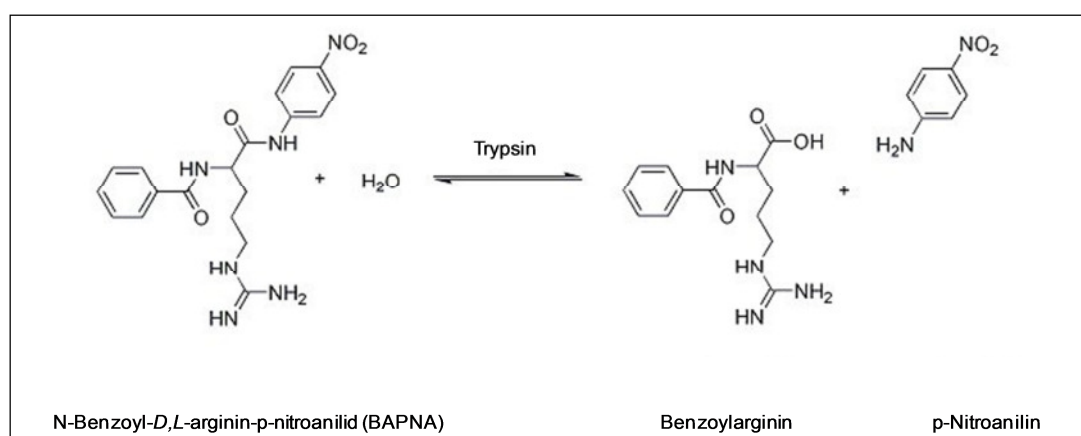
Weiblichen Moskitos wurde einmal pro Woche eine Blutmahlzeit angeboten. Dazu wurde (uninfiziertes) Blut auf den Boden einer Glasflasche gegeben und mit Parafilm bedeckt. Die Flasche wurde mit warmem Wasser gefüllt und auf dem Käfig platziert. Die Fütterung wurde so lange durchgeführt und gegebenenfalls warmes Wasser ergänzt, bis der Erfolg der Fütterung anhand der angeschwollenen Abdomen deutlich sichtbar war.

Zwei bis drei Tage nach der Blutmahlzeit erfolgte über Nacht die Eiablage in kleine, mit Wasser gefüllte Glasschalen, die mit Filterpapier ausgelegt wurden. Die Eier wurden am folgenden Tag aus dem Käfig entnommen und in mit Wasser gefüllte weiße Plastikwannen überführt, damit dort innerhalb der nächsten 2 bis 3 Tage die Larven schlüpfen konnten. Für die Aufzucht wurde VE-Wasser mit 1 % Meersalz verwendet, das vor Gebrauch in der Klimakammer bis zur Umgebungstemperatur erwärmt wurde. Die Larven wurden einmal täglich mit Katzentrockenfutter (Brekki's) gefüttert, das gegebenenfalls zerkleinert und jeden Tag erneuert wurde. Nach weiteren 2 bis 3 Tagen wurde die Zahl der Larven durch das Verteilen auf mehrere Wannen verringert, um eine gute Entwicklung der Larven sicherzustellen. Etwa 8 bis 10 Tage nach dem Schlüpfen verpuppten sich die Larven. Diese wurden täglich mittels einer Pipette von der Wasseroberfläche abgesammelt und in einer Glasschale in einen neuen Käfig überführt. Dort schlüpften am folgenden Tag die Imagines. Die Schale wurde mit einem Filterpapier abgedeckt, in das für die adulten Moskitos ein ausreichend großes Loch geschnitten wurde. So wurde verhindert, dass die Moskitos nach dem Schlüpfen zurück in das Wasser flogen und dort ertranken. Die neue Generation Moskitos wurde nach 4 bis 5 Tagen mit Blut gefüttert und der Zyklus von neuem durchlaufen. Die adulten Moskitos standen dann neben der Erhaltung der Population für weitere Anwendungen wie die Fütterungsversuche mit Proteinextrakten von *N. benthamiana* zur Verfügung. Überschüssige Larven wurden durch Erhitzen in der Mikrowelle getötet.

Die Imagines wurden zwischen den Blutmahlzeiten mit einer Lösung aus 10 % (w/v) Saccharose und 0.05 % (w/v) *para*-Aminobenzoesäure gefüttert, die auf einem Wattepad angeboten und täglich erneuert wurde. Um einer Besiedelung der Käfige mit Pilzen o. Ä. entgegenzuwirken, wurden die Käfige täglich wenigstens auf der Oberseite mit 70 %-igem (v/v) Ethanol desinfiziert.

### 2.2.5.2 Untersuchungen zur Funktionalität der rekombinanten Proteine mittels Trypsin-Inhibition

Die heterolog exprimierten Proteine können durch den Test der Trypsin-Inhibition hinsichtlich ihrer Funktionalität beurteilt werden. Dazu wurde eine definierte Menge an Trypsin mit verschiedenen Konzentrationen des inhibitorischen Proteins inkubiert und anschließend zur Messung der verbliebenen Aktivität mit dem synthetischen chromogenen Substrat N-Benzoyl-D,L-arginin-p-nitroanilid (BAPNA) versetzt. Die Freisetzung von p-Nitroanilin aus BAPNA durch Trypsin (Abb. 2.1) kann durch die Messung des Anstiegs der Absorption bei 405 nm direkt verfolgt werden und ist ein Maß für die Enzymaktivität beziehungsweise die inhibitorische Wirksamkeit der rekombinanten Proteine.



**Abbildung 2.1. Reaktion von BAPNA mit Trypsin.** Die Konzentration des gelben Hydrolyseprodukts p-Nitroanilin kann photometrisch bei 405 nm bestimmt werden.

Für die Bestimmung der Enzymaktivität wurde die Konzentration der Trypsinlösung so gewählt, dass bei einer Konzentration an BAPNA von 0.5 mM die Änderung der Absorption der Lösung bei 405 nm zwischen 0.05 und 0.1 lag. Dann wurden in einer Einmalküvette jeweils 100 µl Trypsinlösung mit 100 µl einer Lösung des gereinigten Proteins gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wobei serielle Verdünnungen des inhibitorischen Proteins getestet wurden (Verdünnungsreihe). Als Negativ-Kontrolle („Blank“, 100 % Trypsinaktivität) wurden parallel 100 µl Trypsinlösung mit 100 µl Phosphatpuffer inkubiert. Anschließend wurde zu den Ansätzen 700 µl Phosphatpuffer gegeben, der Nullabgleich durchgeführt und 100 µl Substratlösung (BAPNA) zugesetzt (Gesamtvolumen: 1 ml; Verdünnungsfaktor: 10). Die Änderung der Absorption bei 405 nm ( $\Delta A_{405}$ ) wurde bei RT vier Minuten lang verfolgt und jeweils der Wert für  $\Delta A_{405}/\text{min}$  bestimmt. Die gemessene Absorption ist unter konstanten Bedingungen der (verbleibenden) Trypsinaktivität proportional.

Alle Absorptionsmessungen erfolgten mit dem Spektrophotometer Typ 6310 (Jenway) in Einwegküvetten der Schichtdicke  $d = 1$  cm. Der Verlauf der Änderung der Absorption wurde

gegen die Zeit aufgetragen und aus der Steigung der Geraden der Wert der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit  $v_0$  [ $\Delta A_{405}/\text{min}$ ] ermittelt.

Grundlage ist hierbei das Lambert-Beer-Gesetz, das die exponentielle Abnahme der Lichtintensität eines Lichtstrahls beim Durchtritt durch eine absorbierende Probelösung der Konzentration  $c$  mit der Schichtdicke  $d$  beschreibt:

$$I_1 = I_0 e^{-\epsilon \cdot c \cdot d} \quad (1)$$

$I_0$ : eingestrahlte Lichtintensität

$I_1$ : abgeschwächte Lichtintensität

$\epsilon$ : dekadischer molarer Extinktionskoeffizient [ $\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ].

Durch Umformen von (1) ergibt sich folgende Gleichung, die zur Konzentrationsbestimmung von Lösungen einer absorbierenden Verbindung herangezogen werden kann:

$$-\lg \left( \frac{I_1}{I_0} \right) = \epsilon \cdot c \cdot d = A \quad (2)$$

$\epsilon$ : dekadischer molarer Extinktionskoeffizient [ $\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ]

$c$ : Konzentration der absorbierenden Substanz [ $\text{mol}$ ]

$d$ : Schichtdicke der durchstrahlten Lösung [ $\text{cm}$ ]

$A$ : Absorption

Die Berechnung der Trypsinaktivität (TA) kann nach folgender Formel erfolgen:

$$\text{TA (mmol/min)} = \frac{\Delta A/\text{min} \cdot \text{VF} \cdot \text{EV}}{\epsilon \cdot d \cdot \text{PV}} \quad (3)$$

$\Delta A$ : Änderung der Absorption

VF: Verdünnungsfaktor (10)

EV: Endvolumen der Probenlösung (1 ml)

$\epsilon$ : molarer Extinktionskoeffizient für p-Nitroanilin bei 405 nm ( $9.6 \text{ mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )

$d$ : Schichtdicke der Probenlösung (1 cm)

PV: Probenvolumen (0.1 ml)

Da hierbei außer dem Wert für  $\Delta A/\text{min}$  alle sonstigen Parameter bei definierten Laborbedingungen konstant sind, ist die gemessene Absorptionsänderung pro Minute der (verbleibenden) Trypsinaktivität direkt proportional.

Um die Aktivität des Inhibitors abzuschätzen, kann die gemessene Absorptionsänderung pro Minute bzw. die verbleibende Trypsinaktivität in einem Diagramm gegen die Konzentration des Inhibitors aufgetragen werden. Dazu lässt sich folgender Zusammenhang für die Trypsininhibitoraktivität (TIA) formulieren:

$$TIA = \frac{\Delta A}{c \text{ (Inhibitor)}} \quad (4)$$

Dabei drückt die TIA die Trypsinmenge aus, die durch eine bestimmte Menge an Inhibitor unter den gegebenen Bedingungen gehemmt wird. Durch Einsetzen von Gleichung (3) in Gleichung (4) ergibt sich:

$$TIA = \frac{TA}{c \text{ (Inhibitor)}} \quad (5)$$

Aus Gleichung (5) lässt sich ableiten, dass die TIA umso größer ist, je niedriger die nötige Konzentration des Inhibitors ist, um die Trypsinaktivität um 50 % zu reduzieren.

**Phosphatpuffer:** 67 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
pH 7.6 mit NaOH

**Substrat-Lösung:** 5 mM BAPNA in 10 % (v/v) DMSO, Phosphatpuffer

**Trypsinlösung:** 0.5 bis 1 mg/ml in Phosphatpuffer



### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Heterologe Expression und Analyse der SM1-Peptid-Varianten

Wie zuvor beschrieben (Kap. 1.4.1) identifizierten Ghosh *et al.* im Jahre 2001 ein synthetisches Dodecapeptid, das *salivary gland and midgut peptide 1* (SM1), das mit hoher Affinität an die luminale Seite des Mitteldarmepithels und an die distalen Speicheldrüsenlappen von *Anopheles* bindet und so sowohl die Invasion der Zellen des Mitteldarms durch die Ookineten als auch das Eindringen der Sporozoiten von *Plasmodium* in die Speicheldrüse effizient inhibierte (Ghosh *et al.*, 2001). Darüber hinaus konnten Ito *et al.* in weiterführenden Untersuchungen mit transgenen Moskitos zeigen, dass das SM1-Peptid die Transmission von *Plasmodium* vom Moskito auf die Maus effizient blockieren kann (Ito *et al.*, 2002).

In einem ersten Schritt wurde das SM1-Peptid in ein Cystin-Knoten-Mikroprotein (CKM, *Knottin*) eingebracht. Cystin-Knoten-Mikroproteine (CKM) sind durch ihre besondere chemische und enzymatische Stabilität und dreidimensionale Struktur prädestiniert zur Verwendung als molekulares Grundgerüst (*scaffold*) für die Generierung neufunktionaler Moleküle. So konnte z. B. die Inhibitor-Schleife des Trypsin-Inhibitors EETI-II ohne Verlust der strukturellen Integrität gegen neue Sequenzen ausgetauscht und damit die Funktion der eingebrachten Sequenzen übertragen werden (Christmann *et al.*, 1999; Hilpert *et al.*, 2003). CKM können hier also den idealen Rahmen bilden und in Fütterungsexperimenten mit *Anopheles* integrierten antiplasmodialen Proteinen die nötige Stabilität für eine verlängerte Verweildauer in der Mücke verleihen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden als *scaffolds* für das SM1-Peptid der pflanzliche Trypsin-Inhibitor MCoTI-II aus den Samen von *Momordica cochinchinensis* (Felizmenio-Quimio *et al.*, 2001) und als Vertreter eines humanen CKM eine minimierte Variante des *Human Agouti-Related Protein* (AGRP; Jackson *et al.*, 2002) ausgewählt, wobei die inhibierende bzw. die Rezeptorbindende Schleife gegen das SM1-Peptid ausgetauscht wurden (Abb. 3.1).

MCoTI-II	MGVCPKILKKCR---RSDCPGACICRGNGYCG
MCoTI-II-SM1	MGVPCQRAIFQSICNRSDCPGACICRGNGYCG
AGRP <sub>87-120</sub>	MGCVRLHESCLGQQVPCCDPAATCYCRFFNAFCY--CR
AGRP <sub>87-120</sub> -SM1	MGCVRLHESCLGQQVPCCDPAATCPCQRAIFQSICNCR

**Abbildung 3.1. Vergleich der Aminosäuresequenzen der verwendeten modifizierten CKM mit und ohne SM1-Peptid.** Die veränderten Aminosäuren sind in Rot hervorgehoben. Weitere Erläuterungen im Text.

Das CKM MCoTI-II (Kap. 1.4.4.1; Abb. 3.1) wurde als erster zyklischer Trypsin-Inhibitor aus der Familie der Kürbis-Gewächse entdeckt (Hernandez *et al.*, 2000) und ist zusammen mit MCoTI-I das einzige bekannte Mitglied der großen Familie von Kürbis-Inhibitoren, die ein zyklisches Grundgerüst und damit eine zusätzliche Peptidbindung besitzen, die den Amino- und Carboxy-Terminus verbindet. Als Grundgerüst für das SM1-Peptid wurde in dieser Arbeit eine offen-kettige Variante des MCoTI-II gewählt (Avrutina *et al.*, 2005).

Der endogene Antagonist der Melanocortin-Rezeptoren MCR3 und -4 des zentralen Nervensystems, das humane AGRP (Kap. 1.4.4.1; Abb. 3.1; Ollmann, 1998), wurde in einer auf das ICK-Motiv minimierten Form als Grundgerüst für SM1 verwendet. Diese 34 Aminosäuren lange Variante besitzt nur die Cystin-Knoten-Domäne, behält aber seine pharmakologische Wirksamkeit auf den Melanocortin-Rezeptor (AGRP<sub>87–120</sub>; Jackson *et al.*, 2002). AGRP wird im Hypothalamus gebildet und besitzt orexigene Eigenschaften (McNulty *et al.*, 2001; Jackson *et al.*, 2002).

Um desweiteren verschiedene Expressionssysteme und gegebenenfalls deren Einfluss auf die Akkumulationsrate und insbesondere die Aktivität der rekombinanten Proteine zu untersuchen, wurden je nach Anwendung und Anforderung verschiedene SM1-Peptid-Varianten generiert. Neben der bakteriellen heterologen Expression in *E. coli* sollte die Produktion der Proteine auch transient in *Nicotiana benthamiana* mit dem von der Firma *ICON Genetics* (Halle/Saale) entwickelten viralen System (Kap. 1.5.1) erfolgen. Außerdem sollten die Proteine unter der Kontrolle eines Phloem-spezifischen Promotors stabil in *Ricinus communis* exprimiert werden und schließlich für Fütterungsexperimente an *Anopheles stephensi* zur Verfügung stehen, um den inhibitorischen Effekt der erzeugten SM1-Peptid-Varianten auf *Plasmodium berghei* zu beurteilen. Eine Übersicht der erzeugten SM1-Peptid-Varianten liefert Tabelle 3.1.

Tabelle 3.1: Übersicht der erzeugten SM1-Peptid-Varianten mit Angabe des verwendeten Expressionssystems sowie der in dieser Arbeit untersuchten Funktion. Die einzelnen Konstrukte sind im nachfolgenden Text näher beschrieben.

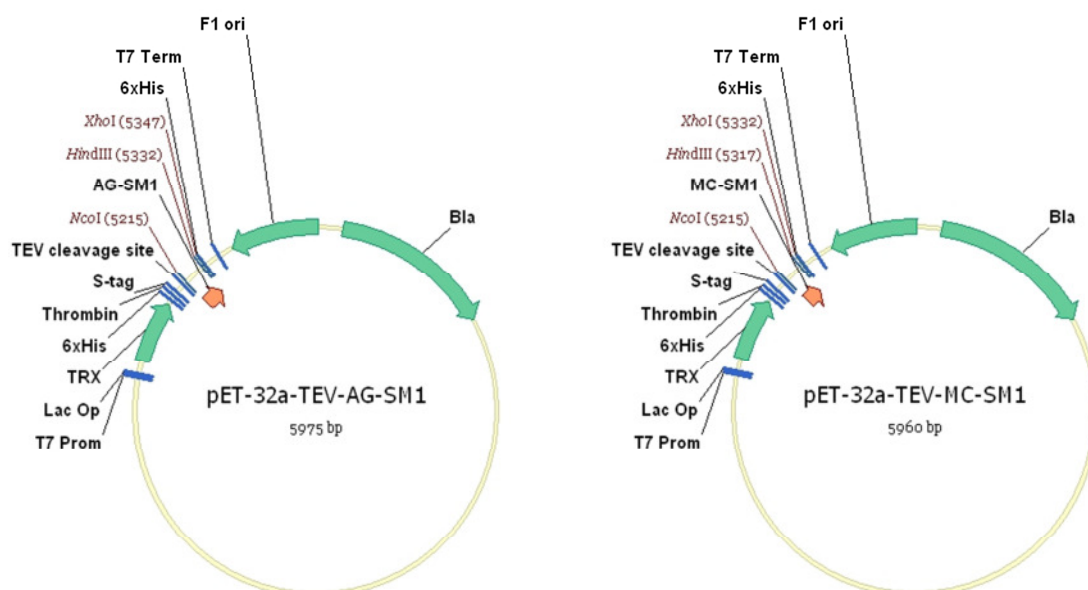
Peptid	Varianten	Expressionssystem	untersuchte Funktion
<b>MCoTI-II</b>	MCOTI001	<i>N. benthamiana</i>	Negativ-Kontrolle
	TRX:MCoTI-II	<i>E. coli</i> Origami(DE3)	
	GFP:MCoTI-II	<i>N. benthamiana</i>	
<b>MCoTI-II-SM1</b>	MCOTI002	<i>N. benthamiana</i>	Inhibitor
	TRX:MCoTI-II-SM1	<i>E. coli</i> Origami(DE3)	
	GFP:MCoTI-II-SM1	<i>N. benthamiana</i>	
<b>AGRP-SM1</b>	TRX:AGRP-SM1	<i>E. coli</i> Origami(DE3)	Inhibitor
	GFP:AGRP-SM1	<i>N. benthamiana</i>	
<b>[SM1]<sub>8</sub></b>	TRX:[SM1] <sub>8</sub>	<i>E. coli</i> Origami(DE3)	Inhibitor
	[SM1] <sub>8</sub>	<i>N. benthamiana</i>	



### 3.1.1 Klonierung der SM1-Peptid-Varianten MCoTI-II-SM1 und AGRP-SM1 sowie der oktameren Variante [SM1]<sub>8</sub>

Das Genmaterial zur Amplifizierung von *mcoti-II-sm1* und *agrp-sm1* wurde im Rahmen einer Diplomarbeit (Tan Thanh Huynh, 2009) generiert und freundlicherweise in Form der Plasmide pET-32a(+)-TEV-MC-SM1 und pET-32a(+)-TEV-AG-SM1 zur Verfügung gestellt (Abb. 3.2).

Dabei waren die CKM so in die Expressionskassette des pET-32a(+)-Vektors integriert worden, dass sie als Fusion mit Thioredoxin, einem Hexa-Histidin-Rest und weiteren Resten exprimiert werden. Diese können zur Detektion und/oder der Reinigung des rekombinanten Proteins dienen. Die Expression des Zielproteins als Thioredoxin-Fusion kann sich zudem wegen der begünstigten Ausbildung von Disulfidbrücken positiv auf die Faltung des Proteins auswirken. Durch die Erkennungssequenz der *Tobacco Etch Virus* (TEV)-Protease kann das Zielprotein nach der Expression und Reinigung von seinen N-terminalen Fusionspartnern abgespalten und separiert werden.

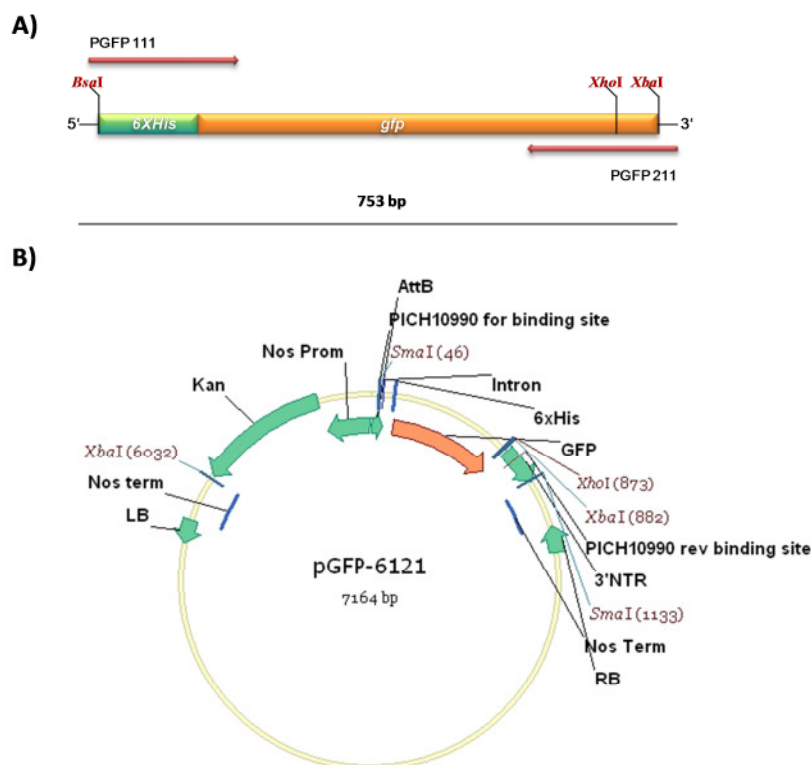


**Abbildung 3.2. Schematische Darstellung der Vektoren pET-32a(+)-TEV-MC-SM1 und pET-32a(+)-TEV-AG-SM1.** Dabei handelt es sich um den bakteriellen Expressionsvektor pET-32a(+), in den das in das entsprechende CKM integrierte SM1-Peptid als *NcoI/HindIII*-Fragment eingebracht wurde. Das Zielprotein wird so als Fusion mit Thioredoxin, einem Hexa-Histidin-Rest und weiteren Resten exprimiert, die zur Detektion oder zur Reinigung herangezogen werden können. Die Expression des Zielproteins als Thioredoxin-Fusion kann sich günstig auf die Faltung und somit auf die Aktivität des Proteins auswirken. TRX, kodierende Sequenz für Thioredoxin; 6xHis, kodierender Bereich für einen Hexa-Histidin-Rest; Thrombin, kodierender Bereich für die Erkennungssequenz der Thrombin-Protease; S-tag, für das S-Epitop kodierender Bereich; TEV cleavage site, kodierender Bereich für die Erkennungssequenz der TEV-Protease; F1 ori, Replikationsursprung des filamentösen Phagen f1; *Bla*, Gen der  $\beta$ -Lactamase; T7 Prom, Promotor des Phagen T7; T7 Term, Terminator des Phagen T7; *Lac Op*, *lac* Promotor/Operator Region.

Anhand der vorliegenden Sequenzen wurden zur Amplifikation und Klonierung von *mcoti-II*, *mcoti-II-sm1* und *agrp-sm1* entsprechende Primer abgeleitet (Tab. 2.6), die es neben der Verwendung des pET-Systems zur bakteriellen Expression in *E. coli* erlaubten, die Zielsequenzen als *XhoI/XbaI*-Fragmente in den Vektor pGFP-6121 (Abb. 3.3) zu inserieren und damit unter Verwendung des von der Firma *ICON Genetics* entwickelten viralen Systems als GFP-Fusion transient in *Nicotiana benthamiana* zu exprimieren.

### 3.1.1.1 Klonierung des Expressionsvektors pGFP-6121

Bei dem Vektor pGFP-6121 (Abb. 3.3) handelt es sich um das 3'-Modul pICH10990 der Firma *ICON Genetics*, in welches zwischen die Restriktionsschnittstellen für *BsaI* und *XbaI* eine modifizierte *gfp*-Sequenz eingebracht wurde. Dabei diente zur Generierung des *gfp* der *ICON*-Vektor pICH7410 (Kap. 2.1.8) als Vorlage in einer PCR mit den Primern *PGFP 111* und *PGFP 211* (Tab. 2.6), wobei an die kodierende Sequenz des *gfp* N-terminal die Restriktionsschnittstelle für *BsaI* und ein Hexa-Histidin-Rest, C-terminal die Restriktionsschnittstellen für *XhoI* und *XbaI* eingebracht wurden (Abb. 3.3).



**Abbildung 3.3. Schematische Darstellung der modifizierten *gfp*-Sequenz (A) und des Vektors pGFP-6121 (B).** In das 3'-Provektor-Modul (B) können Zielsequenzen als *XhoI/XbaI*-Fragmente eingebracht und transient als GFP-Fusion exprimiert werden. Die Fusion eines Hexa-Histidin-Rests ermöglicht die Detektion und die Reinigung des Fusionsproteins. Vektor pGFP-6121 ist ein Abkömmling des *ICON*-Vektors pICH10990 (Giritch *et al.*, 2006).

Das etwa 750 bp große PCR-Produkt wurde nach der Elektrophorese aus dem Gel eluiert, in den Klonierungsvektor pCR2.1 ligiert und der Ligationsansatz zur Transformation kompetenter *E. coli* TOP10 verwendet. Nach der Identifizierung positiver Klone mittels PCR unter Verwendung der Primer *PGFP 111* und *PGFP 211* (Tab. 2.6) wurden diese in Ampicillin-haltigem LB-Medium kultiviert. Schließlich wurde das Plasmid isoliert, mittels Restriktionsverdau mit *Bsal* und *XbaI* auf das Insert getestet und zur Überprüfung der Basenfolge anschließend sequenziert. Nach der Überprüfung der Nukleotidsequenz erfolgte hier die Isolierung als *Bsal/XbaI*-Fragment und die Ligation in den mit *Bsal* und *XbaI* linearisierten *ICON*-Vektor pICH10990 (Kap. 2.1.8). Die Selektion erfolgte auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten und der Transformationserfolg wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer *PICH10990 for* und *-rev* (Tab. 2.6; Abb. 3.3) verifiziert. Positive Klone wurden in Carbenicillin-haltigem LB-Medium kultiviert. Der Austausch von Ampicillin gegen Carbenicillin als Selektionsmarker erfolgte aufgrund der höheren Stabilität von Carbenicillin in flüssiger Kultur. Anschließend wurde das neue Plasmid pGFP-6121 isoliert und zur Kontrolle einem Restriktionsverdau unterzogen. Da die Restriktionsendonuklease *Bsal* außerhalb ihrer Erkennungssequenz schneidet und somit hier nicht mehr verwendet werden konnte, wurde das Enzym *SmaI* für die Kontrollrestriktion verwendet. Die *gfp*-Insertionsstelle wird von den entsprechenden Restriktionsschnittstellen flankiert, so dass ein etwa 1100 bp großes Fragment detektiert werden konnte.

Das Plasmid pGFP-6121 konnte nun zur Transformation von *A. tumefaciens* GV3101 und transienten GFP-Expression in *N. benthamiana* verwendet und im Folgenden als Positivkontrolle herangezogen werden. Gleichzeitig diente es als zusätzliches 3'-Provektor-Modul, welches es erlaubte, gewünschte Sequenzen als *XhoI/XbaI*-Fragmente zu inserieren und damit transient als GFP-Fusion in *N. benthamiana* zu exprimieren.

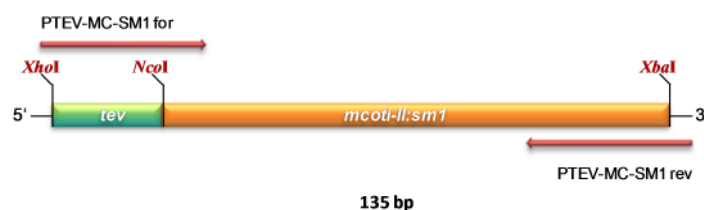
#### 3.1.1.2 Klonierung des Cystin-Knoten-Mikroproteins MCoTI-II-SM1

Plasmid pET-32a(+)-TEV-MC-SM1 (Abb.3.2) diente als Vorlage in einer PCR unter Verwendung der *Taq*-Polymerase und der Primer *PTEV-MC-SM1 for* und *-rev* (Tab. 2.6), durch die N-terminal die Restriktionsschnittstellen für *NcoI* und *XhoI* sowie eine TEV-Protease-Schnittstelle, C-terminal eine Restriktionsschnittstelle für *XbaI* an die kodierende Sequenz von *mcoti-II-sm1* angefügt wurden (Abb. 3.4). Nach der Amplifikation erfolgte die Ligation in den Klonierungsvektor pCR2.1 und die Transformation kompetenter *E. coli* TOP10. Der Transformationserfolg wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer *PTEV-MC-SM1 for* und *-rev* (Tab. 2.6) verifiziert, wobei positive Klone in LB-Medium kultiviert wurden. Nach einer Plasmidpräparation wurde das 135 bp große Insert als *XhoI/XbaI*-Fragment isoliert und in den mit *XhoI* und *XbaI* linearisierten Expressionsvektor pGFP-6121 (Kap. 3.1.1.1, Abb. 3.3) ligiert. Daraus resultierte das Plasmid pGFP:MCoTI-II-SM1-6121. Der Ligationsansatz wurde zur Transformation kompetenter *E. coli* TOP10 herangezogen und das Ergebnis unter Verwendung der Primer *PGFP 111* und *PTEV-MC-SM1 rev* (Tab. 2.6) mittels PCR überprüft. Dabei wurde die Fusion aus *gfp:mcoti-II-sm1* mit einer Größe von etwa 880 bp amplifiziert und positive Klone wurden entsprechend kultiviert. Das Plasmid wurde anschließend erneut isoliert und einem Restriktionsverdau mit der die

Insertionsstelle flankierenden Restriktionsendonuklease *Sma*I (Abb. 3.3) unterzogen, wobei ein etwa 1200 bp großes Fragment detektiert werden konnte. Schließlich wurde das Plasmid unter Verwendung der Primer *PICH10990 for* und *-rev* (Tab. 2.6; Abb. 3.3) sequenziert.

Nach der Überprüfung der Nukleotidsequenz wurde das Plasmid pGFP:MCoTI-II-SM1-6121 zur Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 verwendet und nach einer Inkubationszeit von drei Tagen der Erfolg mittels PCR unter Verwendung der Primer *PICH10990 for* und *-rev* verifiziert. Ein positiver Klon wurde im entsprechenden LB-Medium kultiviert und zur transienten Proteinexpression in *Nicotiana benthamiana* verwendet.

Das Plasmid pET-32a(+)-TEV-MC-SM1 wurde jedoch nicht nur als Matrize für die Generierung des neuen Konstrukts, sondern gleichzeitig selbst zur Transformation von *E. coli* TOP10 eingesetzt und im Folgenden als Plasmid pMCoTI-II-SM1-2711 bezeichnet. Während das Plasmid pGFP:MCoTI-II-SM1-6121 zur Transformation von *A. tumefaciens* und transienten Proteinexpression in *N. benthamiana* verwendet wurde, diente das Plasmid pMCoTI-II-SM1-2711 zur Transformation von *E. coli* Origami(DE3) und der bakteriellen Proteinexpression als Thioredoxin (TRX)-Fusion. Dabei erfolgte nach der Transformation die Selektion der Zellen auf Tetracyclin-, Kanamycin- und Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten. Die Überprüfung des Transformationserfolgs wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer *PTEV-MC-SM1 for* und *-rev* (Tab. 2.6) durchgeführt und positive Klone im entsprechenden LB-Medium über Nacht kultiviert. Die Kulturen wurden schließlich zur Isolation des Plasmids verwendet, welches außerdem zur Überprüfung der Anwesenheit des Inserts einer Kontrollrestriktion mit *Nco*I und *Hind*III unterzogen wurde. Die Zellen konnten nun zur bakteriellen Expression von MCoTI-II-SM1 verwendet werden, wobei die Proteinexpression mit IPTG induziert wurde.



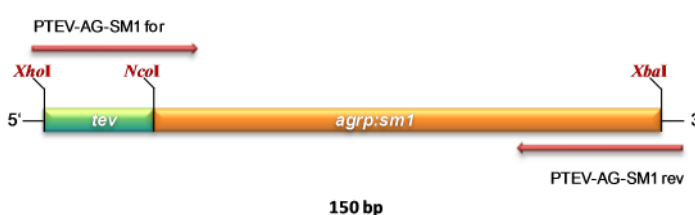
**Abbildung 3.4. Schematische Darstellung des Konstrukts *mcoti-II-sm1*.** Die kodierende Sequenz wurde mittels der Primer *PTEV-MC-SM1 for* und *-rev* modifiziert. So erhielt sie N-terminal die Restriktionsschnittstellen für *Xho*I und *Nco*I sowie die Erkennungssequenz für die TEV-Protease, C-terminal wurde eine Restriktionsschnittstelle für *Xba*I angefügt. Diese Modifikationen sollten die transiente Expression von MCoTI-II-SM1 als GFP-Fusion in *N. benthamiana* unter Verwendung des Vektors pGFP-6121 ermöglichen.

### 3.1.1.3 Klonierung des Cystin-Knoten-Mikroproteins AGRP-SM1

Analog zu *mcoti-II-sm1* diente Plasmid pET-32a(+)-TEV-AG-SM1 als Matrize in einer PCR mit den Primern *PTEV-AG-SM1 for* und *-rev* (Tab. 2.6), durch die an die kodierende Sequenz von *agrp-sm1* am N-Terminus die Restriktionsschnittstellen für *Nco*I und *Xho*I sowie eine TEV-

Protease-Schnittstelle, am C-Terminus eine Restriktionsschnittstelle für *Xba*I angefügt wurden (Abb. 3.5).

Nach der Überprüfung der Nukleotidsequenz erfolgte auch hier die Isolation als *Xho*I/*Xba*I-Fragment und die Ligation in den Vektor pGFP-6121 (Abb. 3.3). Daraus resultierte das Plasmid pGFP:AGRP-SM1-6121, das entsprechend zur Transformation von *A. tumefaciens* GV3101 und transienten Proteinexpression in *N. benthamiana* verwendet werden konnte. Gleichzeitig wurde auch das Plasmid pET-32a(+)-TEV-AG-SM1 selbst in *E. coli* TOP10 propagiert und im Folgenden als Plasmid pAGRP-SM1-2711 bezeichnet, welches anschließend der Transformation von *E. coli* Origami(DE3) und der bakteriellen Proteinexpression von AGRP-SM1 diene.



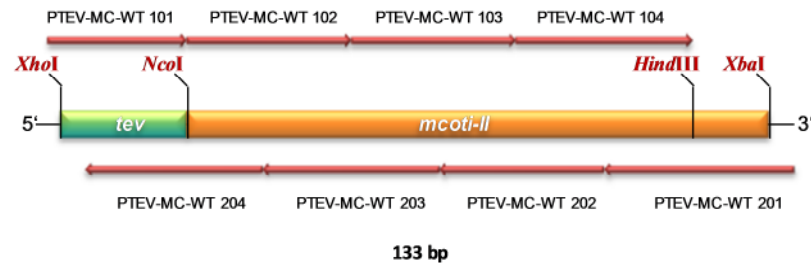
**Abbildung 3.5. Schematische Darstellung des Konstrukts *agrp-sm1*.** Die kodierende Sequenz wurde mittels der Primer *PTEV-AG-SM1 for* und *-rev* modifiziert und N-terminal die Restriktionsschnittstellen für *Xho*I und *Nco*I sowie die Erkennungssequenz für die TEV-Protease eingeführt. C-terminal wurde eine Restriktionsschnittstelle für *Xba*I angefügt. Diese Modifikationen sollten die transiente Expression von AGRP-SM1 als GFP-Fusion in *N. benthamiana* unter Verwendung des Vektors pGFP-6121 ermöglichen.

#### 3.1.1.4 Klonierung des Cystin-Knoten Mikroproteins MCoTI-II

Zusätzlich war es nötig, als Kontrolle für den inhibitorischen Effekt des SM1 eine Variante ohne das SM1-Peptid zu generieren, um gleichzeitig eine *Plasmodium*-inhibitorische Wirkung des solitären Mikroproteins MCoTI-II bei Fütterungsexperimenten beurteilen bzw. ausschließen zu können. Die Sequenz des solitären *mcoti-II* wurde von Harald Kolmar, TU Darmstadt, zur Verfügung gestellt und daraus die Primer *PMC-WT 101*, *-102*, *-103*, *-104* sowie *PMC-WT 201*, *-202*, *-203* und *-204* (Tab. 2.6) abgeleitet, mit denen mittels PCR das gewünschte Fragment amplifiziert wurde. Dabei decken die Primer *PMC-WT 101* bis *104* den *antisense*-Strang, die Primer *PMC-WT 201* bis *204* den *sense*-Strang des *mcoti-II*-Gens ab und sind jeweils zu Bereichen von zwei Primern des Gegenstrangs komplementär (Abb. 3.6). So konnte die Sequenz des *mcoti-II* allein unter Verwendung o. g. Primer hergestellt und amplifiziert werden. Dabei wurden außerdem N-terminal die Restriktionsschnittstellen für *Xho*I und *Nco*I sowie eine TEV-Protease-Schnittstelle an die kodierende Sequenz angefügt. Gleichzeitig erfolgte die Addition von Restriktionsschnittstellen für *Hind*III und *Xba*I an das C-terminale Ende (Abb. 3.6).

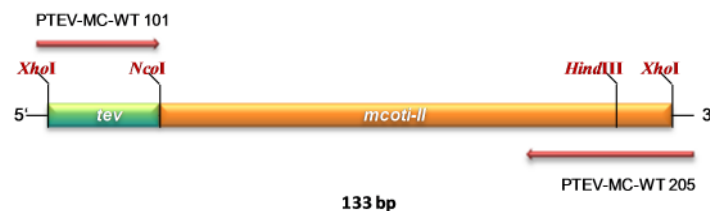
Diese Variante des *mcoti-II* wurde nach der Überprüfung der Sequenz und Isolation als *Xho*I/*Xba*I-Fragment ebenfalls zur Ligation in pGFP-6121 verwendet. Daraus resultierte das Plasmid pGFP:MCoTI-II-6121, das analog zur Variante mit SM1 (pGFP:MCoTI-II-SM1-6121) zur

Transformation von *A. tumefaciens* GV3101 und transienten Proteinexpression als GFP-Fusion in *N. benthamiana* diente.



**Abbildung 3.6. Schematische Darstellung des Konstrukts *mcoti-II* zur transienten Expression in *N. benthamiana* und der verwendeten Primer.** Die Sequenzen der Primer sind Tabelle 2.6 zu entnehmen. Dabei wurden N-terminal die Restriktionsschnittstellen für *XhoI* und *NcoI* sowie eine TEV-Protease-Schnittstelle an die kodierende Sequenz angefügt. C-terminal erfolgte die Addition von Restriktionsschnittstellen für *HindIII* und *XbaI*.

Weiterhin wurde mit der zuerst generierten Sequenz eine zweite *mcoti-II*-Variante mittels PCR amplifiziert, wobei die Primer *PMC-WT 101* und *PMC-WT 205* (Tab. 2.6) verwendet wurden. Dabei erfolgte C-terminal der Austausch der Restriktionsschnittstelle für *XbaI* gegen eine Restriktionsschnittstelle für *XhoI* (Abb. 3.7). Diese zweite Variante des MCoTI-II konnte nach der Überprüfung der Sequenz und Isolierung als *NcoI/XhoI*-Fragment zur Ligation in pET-32a(+) verwendet werden. Daraus resultierte das Plasmid pMCoTI-II-2711, das wiederum zur Transformation von *E. coli* Origami(DE3) und bakteriellen Proteinexpression als Thioredoxin-Fusion herangezogen wurde.



**Abbildung 3.7. Schematische Darstellung des Konstrukts *mcoti-II* zur bakteriellen Expression in *E. coli* und verwendete Primer.** Die Sequenzen der Primer sind Tabelle 2.6 zu entnehmen. Durch die Verwendung des Primers *PMC-WT 205* erfolgte C-terminal der Austausch der Restriktionsschnittstelle für *XbaI* gegen eine Restriktionsschnittstelle für *XhoI*. Diese Variante des MCoTI-II wurde zur Ligation in pET-32a(+) verwendet.

### 3.1.1.5 Klonierung der Cystin-Knoten-Mikroproteine MCOTI001 und MCOTI002

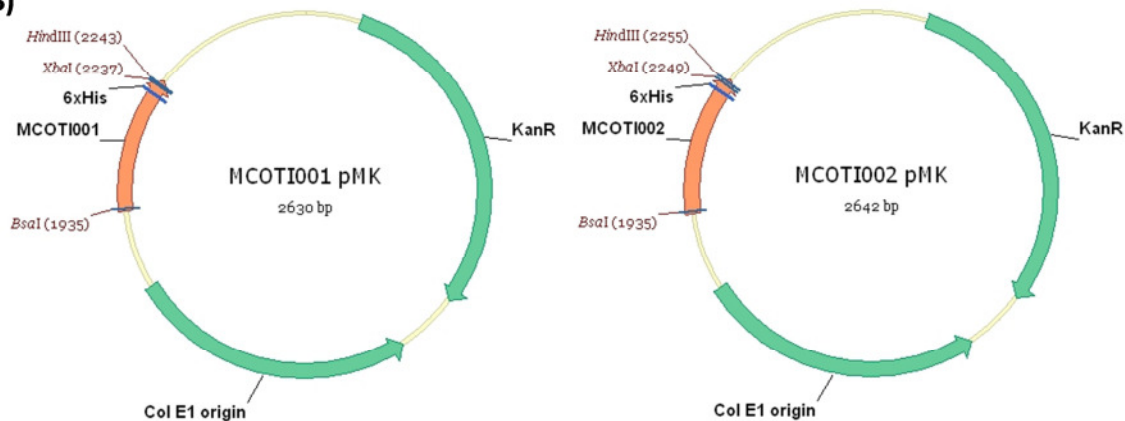
Als weitere Varianten von MCoTI-II bzw. MCoTI-II-SM1, jedoch ohne Fusionspartner (GFP oder TRX), wurden die Konstrukte MCOTI001 und MCOTI002 generiert (Abb. 3.8 A). Hier wurden jeweils zwei Sequenzen der Peptide unter Verwendung eines kurzen Linker-Bereichs aneinandergefügt. Dabei wurde N-terminal eine Restriktionsschnittstelle für *Bsa*I, C-terminal eine Restriktionsschnittstelle für *Xba*I angefügt, um die Klonierung in den *ICON*-Vektor pICH10990 (3'-Pro-Vektor-Modul) und somit die pflanzliche transiente Expression in *N. benthamiana* zu ermöglichen.

Die Konstrukte MCOTI001 und MCOTI002 wurden von der Firma *Mr. Gene* synthetisiert und als Plasmide MCOTI001 pMK und MCOTI002 pMK zur Verfügung gestellt (Abb. 3.8 B).

A)

MCoTI-II	-----MGVCPKILKKCRDSDCPGACICRGNGYCG
MCOTI001 (MCoTI-II)	MSGSDGGVCPKILKKCRDSDCPGACICRGNGYCGSGSGSGSAM-
	--GSDGGVCPKILKKCRDSDCPGACICRGNGYCGSGSEQKLISEEDLHHHHHHH
MCoTI-II-SM1	-----MGVPCQRAIFQSICNRDSDCPGACICRGNGYCG
MCOTI002 (MCoTI-II-SM1)	MSGSDGGV-CQRAIFQSICNRDSDCPGACICRGNGYCGSGSGSGDAM-
	--GSDGGVPCQRAIFQSICNRDSDCPGACICRGNGYCGSGSEQKLISEEDLHHHHHHH

B)



**Abbildung 3.8. Schematische Darstellung der Konstrukte MCOTI001 und MCOTI002.** A) Vergleichende Darstellung der Aminosäuresequenzen von MCOTI001 und MCOTI002. Die Aminosäuresequenzen von MCoTI-II und MCoTI-II-SM1 sind rot hervorgehoben. B) Schematische Darstellung der Vektoren MCOTI001 pMK und MCOTI002 pMK. Die Sequenzen wurden von der Firma *Mr. Gene* synthetisiert und im Klonierungsvektor pMK zur Verfügung gestellt. Der Vektor pMK besitzt zur Selektion in *E. coli* ein Kanamycin-Resistenzgen.

Die Plasmide wurden in *E. coli* TOP10 propagiert und nach der Präparation der Plasmide durch einen entsprechenden Restriktionsverdau die etwa 300 bp großen *Bsa*I/*Xba*I-Fragmente isoliert. Diese wurden in den entsprechend linearisierten *ICON*-Vektor pICH10990 (3'-Pro-Vektor-Modul, Kap. 2.1.8) ligiert. Daraus resultierten die Plasmide pMCOTI001-6121 und pMCOTI002-6121, die



analog zu den anderen Varianten zur Transformation von *A. tumefaciens* GV3101 und transienten Proteinexpression in *N. benthamiana* dienen.

### 3.1.1.6 Klonierung einer oktameren SM1-Peptid-Variante ([SM1]<sub>8</sub>)

Der Pilz *Metarhizium anisopliae* infiziert adulte Moskitos und vermehrt sich in deren Hämolymphe (Fang *et al.*, 2011). Fang *et al.* konnten durch die Entwicklung rekombinanter Stämme von *M. anisopliae*, die eine oktamere Variante des SM1-Peptids exprimierten, in Infektionsmodellen mit *Anopheles* zeigen, dass die Anzahl an *Plasmodium*-Sporozoit in der Speicheldrüse um über 70 % gesenkt werden konnte (Fang *et al.*, 2011).

Um zu überprüfen, ob dieser Effekt auch bei einer einfachen oralen Applikation dieses Peptids nachgewiesen werden kann, wurde in Anlehnung an Fang *et al.* ein Gen synthetisiert, das für 8 Einheiten des SM1-Peptids (PCQRAIFQSI<sub>8</sub>CN) kodiert. Die einzelnen SM1-Einheiten werden dabei durch einen aus vier Aminosäuren bestehenden Linker (GSPG) getrennt (Abb. 3.9).

SM1	--PCQRAIFQSI <sub>8</sub> CN
8XSM1	MGPCQRAIFQSI <sub>8</sub> CN <sub>8</sub> GSPGPCQRAIFQSI <sub>8</sub> CN <sub>8</sub> GS-- PGPCQRAIFQSI <sub>8</sub> CN <sub>8</sub> GSPGPCQRAIFQSI <sub>8</sub> CN <sub>8</sub> GS-- -----PGYPYDVDPYAPIPCQRAIFQSI <sub>8</sub> CN <sub>8</sub> GS-- PGPCQRAIFQSI <sub>8</sub> CN <sub>8</sub> GSPGPCQRAIFQSI <sub>8</sub> CN <sub>8</sub> GS-- PGPCQRAIFQSI <sub>8</sub> CN <sub>8</sub> GSPGLEHHHHHH*

**Abbildung 3.9. Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz von [SM1]<sub>8</sub>.** Dabei ist die Aminosäuresequenz des SM1-Peptids rot hervorgehoben. \*:Stopkodon.

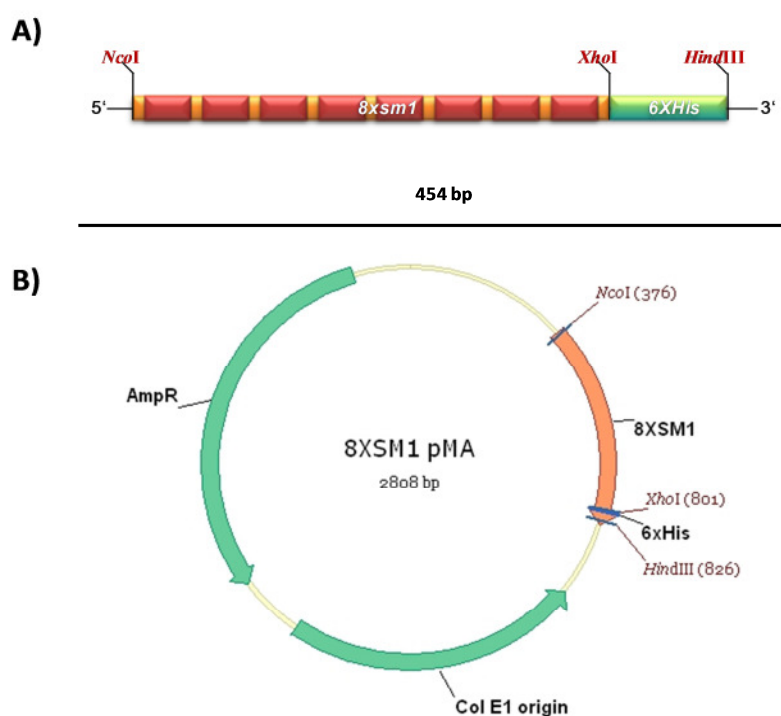
Das Konstrukt [SM1]<sub>8</sub>, kodierend für 8 Einheiten des SM1-Peptids, wurde von der Firma *Mr. Gene* synthetisiert und als Plasmid 8XSM1 pMA zur Verfügung gestellt (Abb. 3.10), wobei N-terminal eine Restriktionsschnittstelle für *Nco*I, C-terminal die Restriktionsschnittstellen für *Xho*I und *Hind*III sowie ein Hexa-Histidin-Rest eingefügt wurden. Dadurch sollte sowohl die bakterielle Expression des Peptids unter Verwendung des pET-Systems, als auch die transiente Expression in *N. benthamiana* ermöglicht werden.

Das Plasmid 8XSM1 pMA wurde in *E. coli* TOP10 propagiert und nach der Präparation des Plasmids durch einen Restriktionsverdau unter Verwendung der Enzyme *Nco*I und *Hind*III das etwa 450 bp große [SM1]<sub>8</sub>-Fragment isoliert. Dieses wurde in den entsprechend linearisierten bakteriellen Expressionsvektor pET-32a(+) (Kap. 2.1.8) ligiert. Daraus resultierte das Plasmid p[SM1]<sub>8</sub>-2711.

Der Ligationsansatz wurde zur Transformation kompetenter *E. coli* TOP10 verwendet, die Verifizierung des Transformationserfolges erfolgte mittels Kolonie-PCR unter Verwendung der Primer *PT7P for* und *PT7T rev* (Tab. 2.6). Diese binden an der T7-Promotor- bzw. -Terminator-Region des Vektors pET-32a(+), so dass ein etwa 800 bp großes Fragment detektiert werden konnte. Positiv getestete Klone wurden im entsprechenden LB-Medium kultiviert. Nach der



Isolierung des Plasmids und der Kontrolle durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen *NcoI* und *HindIII* konnte das Plasmid zur Transformation von *E. coli* Origami(DE3) verwendet werden. Die Überprüfung des Transformationserfolges erfolgte wiederum unter Verwendung der Primer *PT7P for* und *PT7T rev* mittels PCR. Positive Klone wurden über Nacht entsprechend kultiviert. Anschließend wurde auch hier wieder das Plasmid isoliert und mittels Restriktionsverdau mit den Enzymen *NcoI* und *HindIII* überprüft. Schließlich wurden die Zellen zur bakteriellen Expression von [SM1]<sub>8</sub> verwendet.



**Abbildung 3.10. Schematische Darstellung des Konstrukts [SM1]<sub>8</sub>.** Die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *NcoI*, *XhoI* und *HindIII* ermöglichen die Ligation in den *ICON*-Vektor pICH11599 zur transienten pflanzlichen Expression und in den bakteriellen Expressionsvektor pET-32a(+). Der Vektor pMA besitzt zur Selektion in *E. coli* ein Ampicillin-Resistenzgen.

Gleichzeitig wurde das [SM1]<sub>8</sub> als *NcoI*/*HindIII*-Fragment aus dem Plasmid 8XSM1 pMA isoliert und in den mit *NcoI* und *HindIII* linearisierten *ICON*-Vektor pICH11599 (Kap. 2.1.8) ligiert. Daraus resultierte das Plasmid p[SM1]<sub>8</sub>-6321. Nach der Transformation von *E. coli* TOP10 wurden die Zellen entsprechend selektiert und der Erfolg der Transformation unter Verwendung der Primer *PICH10990 for* und *-rev* (Tab. 2.6) verifiziert. Dabei flankieren die Bindungsstellen der Primer die Insertionsstelle des [SM1]<sub>8</sub>, so dass ein etwa 700 bp großes Fragment amplifiziert werden konnte. Positive Klone wurden entsprechend kultiviert und anschließend zur Überprüfung einer Plasmidisolation mit darauffolgender Kontrollrestriktion unter Verwendung der Enzyme *NcoI*

und *HindIII* unterzogen. Das Plasmid p[SM1]<sub>8</sub>-6321 wurde anschließend zur Transformation von *A. tumefaciens* und schließlich zur Infiltration von *N. benthamiana* verwendet.

### 3.1.2 Transiente Expression der Varianten in *N. benthamiana*

Die CKM- bzw. SM1-Peptid-Varianten sollten aufgrund der möglichen schnellen Verfügbarkeit großer Mengen an Protein sowie zur späteren Untersuchung der Akkumulationsrate und Beurteilung der Faltung (Aktivität) der rekombinanten Proteine, auch in Abhängigkeit von der Lokalisation in der Zelle, transient in *Nicotiana benthamiana* exprimiert werden.

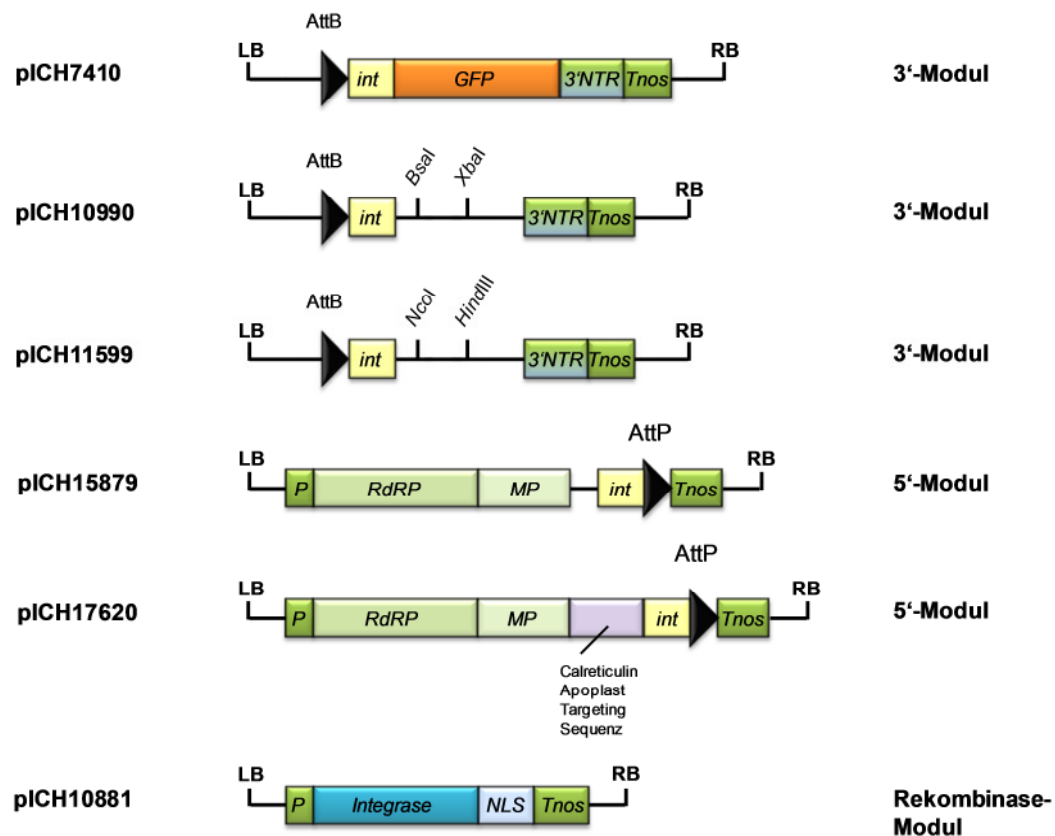
Dabei wurde das auf Pflanzenviren basierende System der Firma *ICON Genetics* verwendet (Kap. 1.5.1, Kap. 2.2.3.4.1). Mit diesem System ist es möglich, in wenigen Tagen bei Akkumulationsraten von bis zu 80 % des LGP und unter Verwendung verschiedener 5'-Pro-Vektor-Module zur gezielten Proteinakkumulation in bestimmten Zellkompartimenten eine ausreichende Menge Protein zu generieren, das anschließend für weitere Anwendungen zur Verfügung stehen konnte. Durch die Verwendung der 5'-Pro-Vektor-Module pICH15879 und pICH17620 sollte hier über die enthaltenen Targeting-Präsequenzen eine Akkumulation der Proteine im Cytosol bzw. Apoplasten ermöglicht werden. Dabei sollten das Potential des pflanzlichen Expressionssystems zur Produktion biologisch aktiven Proteins im Vergleich zum bakteriellen Expressionssystem getestet und gegebenenfalls Unterschiede in der posttranslationalen Modifikation (Disulfidbrücken) im Cytosol oder Apoplasten aufgeklärt werden. Eine Übersicht der infiltrierten Konstrukte mit Angabe der relativen Molekülmasse liefert Tab. 3.2.

Tabelle 3.2: Konstrukte für die transiente Expression mit Angabe der verwendeten 5'-Pro-Vektor-Module.

3'-Module	Vektor	Koinfiltration mit 5'-Modulen	Relative Molekülmasse (M <sub>R</sub> )
<b>GFP:MCoTI-II-6121</b>	pICH10990	pICH15879 / pICH17620	~ 32 x 10 <sup>3</sup>
<b>GFP:MCoTI-II-SM1-6121</b>	pICH10990	pICH15879 / pICH17620	~ 33 x 10 <sup>3</sup>
<b>GFP:AGRP-SM1-6121</b>	pICH10990	pICH15879 / pICH17620	~ 33 x 10 <sup>3</sup>
<b>MCOTI001-6121</b>	pICH10990	pICH15879 / pICH17620	~ 10 x 10 <sup>3</sup>
<b>MCOTI002-6121</b>	pICH10990	pICH15879 / pICH17620	~ 11 x 10 <sup>3</sup>
<b>[SM1]<sub>8</sub>-6321</b>	pICH11599	pICH15879	~ 16 x 10 <sup>3</sup>

Die verschiedenen Varianten waren wie zuvor beschrieben (Kap. 3.1.1) kloniert und in *A. tumefaciens* transformiert worden. Die Anwesenheit der entsprechenden Plasmide wurde wiederholt mittels PCR unter Verwendung der geeigneten Primer überprüft.

Zur Infiltration von *Nicotiana benthamiana* wurden jeweils die entsprechenden 3'-Pro-Vektor-Module über Nacht kultiviert, die Zellen pelletiert und in *ICON*-Puffer aufgenommen. Mit den 5'-Pro-Vektor-Modulen pICH15879 und pICH17620 und dem Rekombinationsmodul pICH10881 wurde analog verfahren; diese standen als Glycerolstocks zur Verfügung. Die Bakteriensuspensionen der einzelnen Module wurden anschließend im Verhältnis 1:1:1 gemischt und die Mischung aus 3'-, 5'- und Rekombinase-Modul mit Hilfe einer Spritze in die Stomata auf der Blattunterseite der *N. benthamiana*-Pflanzen infiltiert. Als Positiv-Kontrolle für die Expression wurde zudem eine Pflanze mit dem für GFP kodierenden 3'-Pro-Vektor-Modul pICH7410 infiltiert. Die binären Vektoren pICH10990, pICH11599, pICH15879, pICH17620, pICH10881 und pICH7410 (pICH-GFP) wurden zuvor bereits beschrieben (Huang *et al.*, 2006; Marillonnet *et al.*, 2004; Santi *et al.*, 2008) und sind schematisch in Abbildung 3.11 dargestellt.

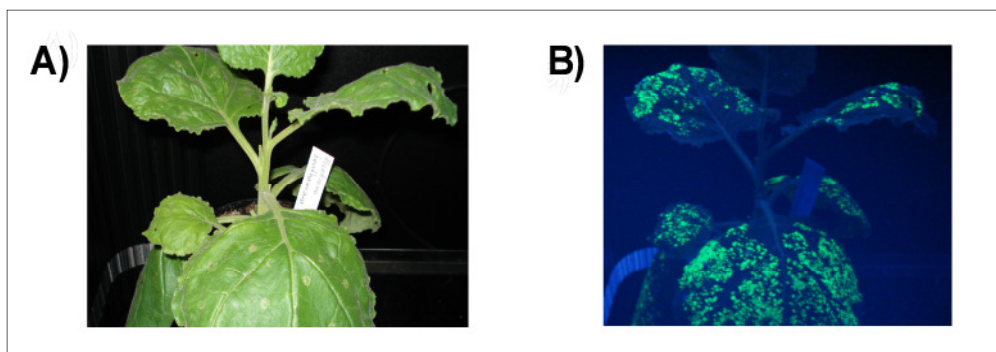


**Abbildung 3.11. Schematische Darstellung der T-DNA-Regionen der binären *ICON*-Vektoren.**

In die multiple Klonierungsstelle der 3'-Module pICH10990 bzw. pICH11599 wurden die Gen-Varianten einkloniert. LB: Left Border; RB: Right Border; P: *Arabidopsis thaliana* ACT2-Promotor; RdRP: Sequenz kodierend für eine RNA-abhängige RNA-Polymerase; MP: Sequenz kodierend für das Movement-Protein; int: Intronsequenz; AttP und AttB: Integrase-Rekombinationsstellen des Bakteriophagen phi C31 von *Streptomyces*; Tnos: Terminator der Nopalinsynthese; NLS: Sequenz kodierend für ein Signalpeptid zur Kernlokation (*nuclear localisation sequence*); Abbildung modifiziert nach Marillonnet *et al.*, 2004.

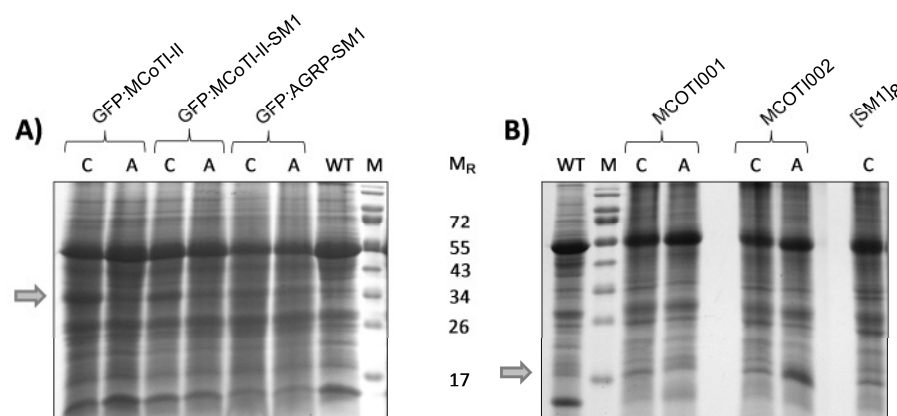
### 3.1.2.1 Charakterisierung infiltrierter Pflanzen und Nachweis der Proteinsynthese

Die infiltrierten *N. benthamiana*-Pflanzen wurden je nach Vitalität der Pflänzchen weitere fünf bis zehn Tage unter Dauerlicht kultiviert. Die Entwicklung der infiltrierten Pflanzen variierte sowohl innerhalb der Pflanzenpopulation als auch zwischen verschiedenen Infiltrationsereignissen stark und reichte von vereinzelten nekrotischen Stellen der Blätter bis zum Welken und letztendlichen Absterben ganzer Pflanzen. Die Proteinakkumulation konnte während dieser Zeit entweder durch die Eigenfluoreszenz der akkumulierten Proteine (GFP-Fusionen; Abb. 3.12) oder durch die Fluoreszenz der zur Funktionskontrolle infiltrierten Pflanze (pICH7410) unter UV-Licht verfolgt werden. Dabei konnte unter Verwendung des 5'-Pro-Vektor-Moduls pICH15879 eine flächige Fluoreszenz der Proteine beobachtet werden, während unter Verwendung des 5'-Pro-Vektor-Moduls pICH17620 die Fluoreszenz wesentlich schwächer ausgeprägt und eher punktuell verteilt war. Schließlich wurden die Blätter geerntet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zu einem feinem Pulver zermörst. Material, das nicht sofort weiterverwendet wurde, wurde zunächst bei -20 °C bzw. -80 °C gelagert.



**Abbildung 3.12. GFP-exprimierende *N. benthamiana*-Pflanze.** A) Unter Normallicht. B) Unter UV-Licht der Wellenlänge 366 nm.

Die Proteinakkumulation wurde mittels SDS-PAGE (Kap. 2.2.4.7) und Western Blot mit anschließender Immunodetektion unter Verwendung spezifischer Antikörper (Kap. 2.2.4.11) nachgewiesen. Dazu wurde zunächst das Blattmaterial entsprechend aufgearbeitet (Kap. 2.2.4.1), die Proteine mittels SDS-PAGE getrennt und das Gel schließlich mit kolloider Coomassie-Lösung gefärbt. So konnte durch den Vergleich mit dem Proteinbandenmuster des *N. benthamiana*-Wildtyps eine erste Aussage über das Ausmaß der Proteinakkumulation im getesteten Blattmaterial getroffen werden. Diese war zumeist für das cytosolisch akkumulierte Protein am höchsten und das rekombinante Protein im gefärbten Gel als eine zusätzliche Bande zu erkennen (Abb. 3.13).

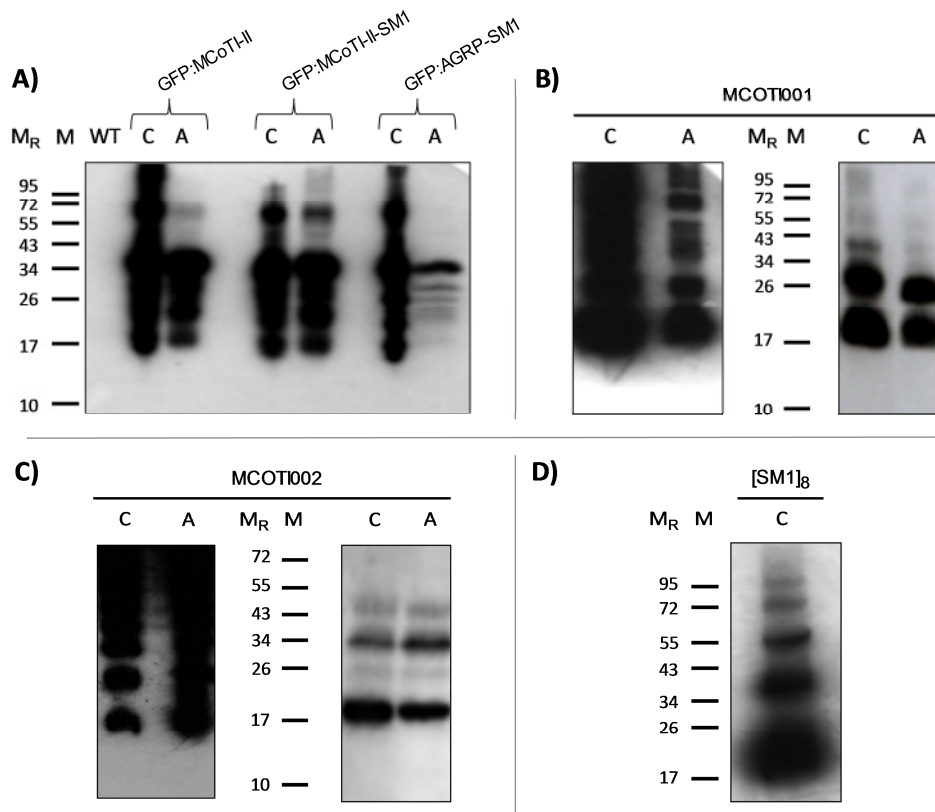


**Abbildung 3.13. SDS-Polyacrylamidgele des Gesamtproteinextrakts infiltrierten *N. benthamiana*-Blattmaterials.** Aufgetragen wurden je 20 µl des Gesamtproteinextrakts von Pflanzen, die mit den 3'-Modulen jeweils in Kombination mit dem 5'-Modul pICH15879 oder pICH17620 infiltriert worden waren. Die Gele wurden mit kolloidaler Coomassie-Lösung gefärbt. A) Gel der GFP-Fusionsproteine, reduzierende Bedingungen. B) Gel der MCOTI-II- bzw. SM1-Varianten, nicht-reduzierende Bedingungen. Die entsprechenden Proteinbanden sind mit einem Pfeil markiert. C: Koinfiltration des 3'-Moduls mit pICH15879 (Akkumulation des Targetproteins im Cytosol); A: Koinfiltration des 3'-Moduls mit pICH17620 (Akkumulation des Targetproteins im Apoplasten); WT: *N. benthamiana* Wildtyp; M: Proteinmarker;  $M_R$ : Angabe der relativen Molekülmasse  $\times 10^3$ .

Unterschiede in der Auftrennung bei der Elektrophorese unter reduzierenden oder nicht-reduzierenden Bedingungen konnten hier nicht festgestellt werden. Eine zufriedenstellende Auftrennung des Gesamtproteinextraktes und Detektion des akkumulierten Proteins allein durch Anfärben wurde jedoch nicht erreicht. Gerade bei nur geringen Akkumulationsraten war eine Detektion der rekombinanten Proteine im Blattextrakt durch Anfärben im SDS-Polyacrylamidgel nicht möglich.

Daher wurde das Blattmaterial zur weiteren Charakterisierung zu einer wiederholten SDS-PAGE mit sich anschließender Immunodetektion herangezogen (Abb. 3.14).

Dazu wurden die aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen und unter Verwendung eines GFP-spezifischen Antikörpers (GFP-Fusionsproteine) bzw. eines gegen den Hexa-Histidin-Rest gerichteten Antikörpers (alle übrigen Varianten) detektiert. Eine Proteinakkumulation im untersuchten Blattmaterial im Cytosol bzw. im Apoplasten konnte so für alle Varianten nachgewiesen werden (Abb. 3.14). Die Proteinakkumulation schwankte dabei jedoch zwischen den einzelnen Infiltrationsereignissen stark. Nach mehrfach wiederholter Infiltration konnte aber schließlich festgestellt werden, dass i) für die GFP-Fusionsproteine die Proteinakkumulation bei Verwendung des 5'-Pro-Vektor-Moduls pICH15879 ohne Targeting-Peptid (Akkumulation im Cytosol) tendenziell höher war als bei Koinfiltration mit dem 5'-Pro-Vektor-Modul pICH17620 mit Apoplast-Targeting-Präsequenz und dass ii) für die Varianten MCOTI001 und MCOTI002 eine solche Tendenz zunächst nicht zu erkennen, wobei die Proteinakkumulation insgesamt zwischen den Infiltrationsereignissen sehr verschieden war.



**Abbildung 3.14. Detektion der rekombinanten Proteine im Gesamtproteinextrakt mittels Immunoblot.** A) GFP-Fusionsproteine; aufgetragen wurden je 1  $\mu$ l (cytosolisch, „C“) bzw. 3  $\mu$ l (apoplastisch, „A“) des Gesamtproteinextrakts aus je 100 mg Blattmaterial. Die Auftrennung erfolgte unter reduzierenden Bedingungen, die Detektion mittels anti-GFP-Antikörper. Exposition des Films: 10 Sekunden. B) und C) MCOT1001 und MCOT1002; verschiedene Infiltrationsereignisse. Aufgetragen wurden je 20  $\mu$ l des Gesamtproteinextrakts aus je 100 mg Blattmaterial. Die Auftrennung erfolgte unter nicht-reduzierenden Bedingungen, die Detektion erfolgte mit einem gegen den Hexa-Histidin-Rest gerichteten Antikörper. Exposition des Films: 5 bis 10 Minuten. D) [SM1]<sub>8</sub>; aufgetragen wurden 30  $\mu$ l des Gesamtproteinextrakts aus 100 mg Blattmaterial. Die Auftrennung erfolgte unter reduzierenden Bedingungen; die Detektion erfolgte mit einem gegen den Hexa-Histidin-Rest gerichteten Antikörper. Exposition des Films: 2 Minuten. M<sub>R</sub>: Angabe der relativen Molekülmasse  $\times 10^3$ . M: Proteinmarker. WT: *N. benthamiana* Wildtyp. C: Koinfiltration des 3'-Moduls mit pICH15879 (Akkumulation des Targetproteins im Cytosol); A: Koinfiltration des 3'-Moduls mit pICH17620 (Akkumulation des Targetproteins im Apoplasten).

### 3.1.2.2 Proteinreinigung der CKM-Varianten aus *N. benthamiana*-Blattmaterial

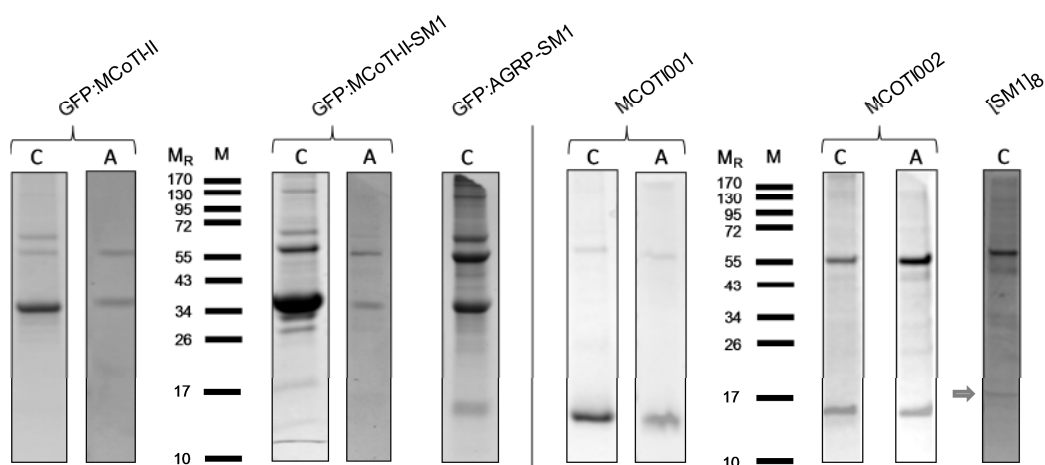
Da es also gelungen war, die Peptide transient in *N. benthamiana* zu produzieren, konnte als nächster Schritt die Reinigung der rekombinanten Proteine erfolgen. Dazu wurde zunächst eine ausreichende Menge pulverisiertes Blattmaterial entsprechend extrahiert (Kap. 2.2.6.1), der Rohextrakt wiederholt zentrifugiert oder filtriert (Partikelfilter, Durchmesser 0.45  $\mu$ m) und anschließend über eine IMAC-Säule unter Verwendung des *Profinia*<sup>TM</sup> Protein Purification Systems der Firma *BioRad* aufgereinigt, wobei die erhaltene Proteinlösung entsalzt wurde (Kap. 2.2.4.3). Die einzelnen Fraktionen bestehend aus Durchfluss (FT), Waschschrift 1 (W1), Waschschrift 2 (W2) und Eluat (E) wurden jeweils in Falcon-Röhrchen aufgefangen,

gegebenenfalls aliquotiert und für spätere Analysen zurückgestellt. Abbildung 3.15 zeigt beispielhaft die Fraktionen der Reinigung von GFP:AGRP-SM1.



**Abbildung 3.15. Teilportionen der Fraktionen der Proteinreinigung von GFP:AGRP-SM1 mittels IMAC unter UV-Licht.** Von links nach rechts: Rohextrakt, Durchfluss, Waschphase 1, Waschphase 2, Eluat. Deutlich zu erkennen ist die Fluoreszenz des GFP-Fusionsproteins im Eluat.

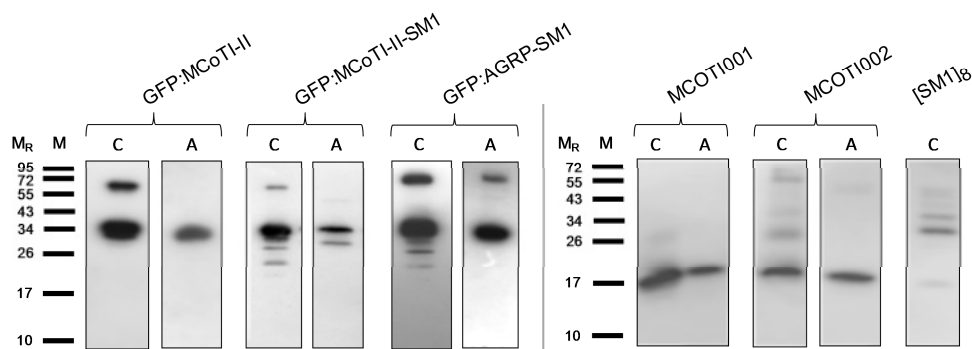
Die Konzentration an gereinigtem Protein im Eluat wurde von dem im System enthaltenen Detektor ermittelt, wobei sowohl ein Chromatogramm mit Graphen u. a. für das UV-Spektrum und die Leitfähigkeit der einzelnen Fraktionen erzeugt wurde, als auch die Daten der Reinigung in tabellarischer Form wiedergegeben wurden. Gegebenenfalls wurde das Ergebnis der Reinigung mittels BCA überprüft. Die Kontrolle des Erfolges der Reinigung erfolgte mittels SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung (Abb. 3.16) und zur spezifischeren Detektion der gereinigten Proteine durch einen Immunoblot unter Verwendung eines GFP-spezifischen Antikörpers (GFP-Fusionsproteine) bzw. eines gegen den Hexa-Histidin-Rest gerichteten Antikörpers (Abb. 3.17).



**Abbildung 3.16. SDS-Polyacrylamidgele der mittels IMAC gereinigten Proteine.** Aufgetragen wurden je 20  $\mu$ l der Eluatfraktion, die Auftrennung erfolgte unter reduzierenden Bedingungen. Die Gele wurden mit kolloidaler Coomassie-Lösung gefärbt.  $M_R$ : Angabe der relativen Molekülmasse  $\times 10^3$ . M: Proteinmarker. C: Koinfiltration des 3'-Moduls mit pICH15879 (Akkumulation des Targetproteins im Cytosol); A: Koinfiltration des 3'-Moduls mit pICH17620 (Akkumulation des Targetproteins im Apoplasten).



Wie erwartet konnte in allen Eluatfraktionen das entsprechende rekombinante Protein nachgewiesen werden, wobei trotz der Zugabe von 10 mM DTT zum Probenpuffer insbesondere unter Verwendung des cytosolischen 5'-Moduls eine Dimer-Bildung beobachtet werden konnte (Abb. 3.16 und 3.17). Es zeigte sich jedoch, dass die Stärke der Proteinbanden der Eluatfraktionen im gefärbten Gel bzw. im Immunoblot nicht immer mit der durch den Detektor des Profinia-Systems ermittelten Proteinkonzentration korrelierte. Dies deutet darauf hin, dass in diesen Fällen Verunreinigungen im Eluat das Ergebnis verfälschten und eine insgesamt höhere Proteinausbeute als tatsächlich vorhanden angezeigt wurde. Die Reinheit der entsalzten Proteinlösungen (Eluatfraktion) war nach nur einer Säulenpassage also nicht immer befriedigend, jedoch für die geplanten späteren Applikationen zunächst ausreichend. Zumeist wurde das Eluat durch RuBisCo (Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase,  $M_R$  ca.  $55 \times 10^3$  und  $18 \times 10^3$ ), welches in sehr hohen Mengen im Blattmaterial enthalten ist, verunreinigt. Eine zweite Passage der Eluatfraktion über eine IMAC-Säule oder eine Gelfiltrationssäule hätte eventuell eine höhere Reinheit der Proteinlösungen ergeben, aber wohl auch recht hohe Proteineinbußen bedeutet.



**Abbildung 3.17. Immunoblot der Eluatfraktionen der transient exprimierten Proteine.**

Aufgetragen wurden je 1 bis 20  $\mu$ l der Eluatfraktion. Die Detektion der Proteine erfolgte mit einem anti-GFP-Antikörper (GFP-Fusionsproteine) bzw. einem gegen den Hexa-Histidin-Rest gerichteten Antikörper.  $M_R$ : Angabe der relativen Molekülmasse  $\times 10^3$ . M: Proteinmarker. C: Koinfiltration des 3'-Moduls mit pICH15879 (Akkumulation des Targetproteins im Cytosol); A: Koinfiltration des 3'-Moduls mit pICH17620 (Akkumulation des Targetproteins im Apoplasten).

Die unterschiedlichen Proteinakkumulationsraten der verschiedenen Infiltrationsereignisse spiegelten sich auch bei der IMAC-Reinigung der Proteine aus dem Blattmaterial wider. So konnten zwar alle transient exprimierten Varianten mittels IMAC gereinigt werden (Abb. 3.16 und 3.17), die Ausbeute an isoliertem rekombinantem Protein variierte dabei jedoch erheblich. Die Menge an gewonnenem Protein war bei konstantem Materialeinsatz aber nicht nur vom Infiltrationsereignis und 3'-Pro-Vektor-Modul abhängig, sondern auch davon, wie oft die IMAC-Säule zuvor schon zur Reinigung des Proteins verwendet und regeneriert worden war. Obwohl für die verwendeten Säulen vom Hersteller bis zur erforderlichen Regeneration eine mehrfache



Verwendung deklariert wurde, nahm die Bindekapazität des Säulenmaterials schon nach einmaligem Gebrauch mit der Folge sinkender Proteinausbeuten stetig ab.

Dennoch konnten nach mehrfach wiederholter Infiltration und Reinigung die entsprechenden Varianten aus dem Blattmaterial in ausreichender Menge isoliert werden. Dabei wurden aus 10 g Blattmaterial etwa zwischen 1 und 6 mg rekombinantes Protein gewonnen, wobei die im Cytosol der Pflanzenzelle akkumulierten Proteine zumeist ein besseres Ergebnis lieferten.

Die gereinigten Proteine standen anschließend für weitere Anwendungen wie die Aufklärung der Faltung und biologischen Aktivität sowie für Fütterungsexperimente mit *Anopheles* zur Verfügung.

### 3.1.3 Bakterielle Expression der Varianten in *E. coli*

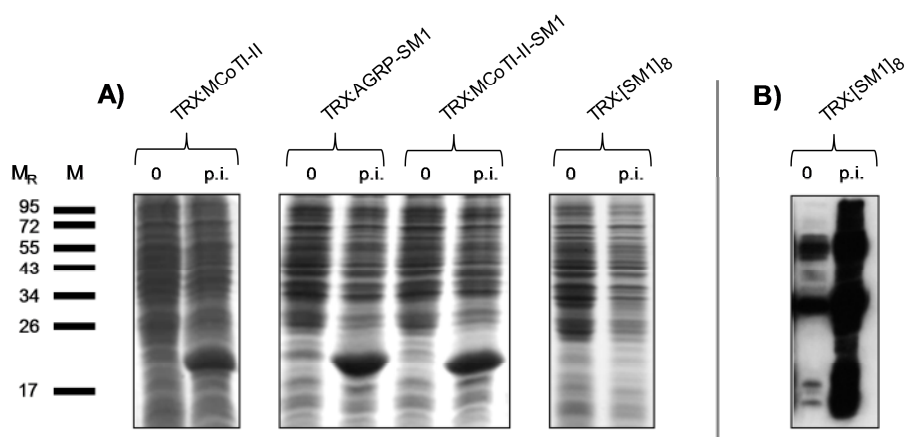
Für alle genannten Konstrukte galt es, in ausreichender Menge biologisch aktives Protein zu produzieren, da anschließend das inhibitorische Potential der rekombinanten Proteine auf *Plasmodium* in Fütterungsexperimenten mit *Anopheles stephensi* untersucht werden sollte. Obwohl das verwendete transiente pflanzliche Expressionssystem in kurzer Zeit große Mengen an aktivem rekombinantem Protein liefern kann, sind diesem Produktionssystem doch auch Grenzen gesetzt. So wird es z. B. von der Größe des zu exprimierenden Proteins limitiert, was bedeutet, dass sehr kleine Proteine nicht oder nur in Fusion mit einem (größeren) Partner (in dieser Arbeit: GFP) exprimiert werden können. Außerdem zeigte sich, dass sich nicht alle Konstrukte gleich gut in *N. benthamiana* exprimieren ließen (Kap. 3.1.2). Um also die für die geplanten Anwendungen erforderliche Menge an rekombinantem Protein zu erzielen, wurde als Alternative zur pflanzlichen transienten Expression auch die bakterielle Expression der Peptide in *E. coli* versucht. In diesem Zusammenhang stellte sich zudem die Frage, ob auch mit dem bakteriellen System eine Produktion von biologisch aktivem Protein möglich wäre.

Die verschiedenen Varianten wurden wie zuvor erläutert (Kap. 3.1.1) unter Verwendung des bakteriellen Expressionsvektors pET-32a(+) kloniert und in *E. coli* Origami(DE3) transformiert. Eine Übersicht der bakteriell exprimierten MCoTI-II- bzw. SM1-Peptid-Varianten gibt Tabelle 3.3.

Tabelle 3.3: Übersicht der bakteriell exprimierten Varianten mit Angabe der zu erwartenden relativen Molekülmasse.

Konstrukt	Vektor	Nomenklatur	Relative Molekülmasse ( $M_R$ )
<b>MCoTI-II</b>	pET-32a(+)	pMCoTI-II-2711	$\sim 20 \times 10^3$
<b>MCoTI-II-SM1</b>	pET-32a(+)	pMCoTI-II-SM1-2711	$\sim 21 \times 10^3$
<b>AGRP-SM1</b>	pET-32a(+)	pAGRP-SM1-2711	$\sim 21 \times 10^3$
<b>[SM1]<sub>8</sub></b>	pET-32a(+)	p[SM1] <sub>8</sub> -2711	$\sim 33 \times 10^3$

Dabei wurden durch die Verwendung des Expressionsvektors pET-32a(+) die Zielproteine als Fusion mit Thioredoxin exprimiert, um so die Ausbildung der für die Aktivität der Peptide essentiellen Disulfidbrücken im reduzierenden Milieu des bakteriellen Cytoplasma zu begünstigen. Zur Induktion der Proteinexpression wurde eine je nach Anwendung ausreichende Menge LB-Medium (100 bis 600 ml) mit einer *E. coli*-Kultur inokuliert, wie in Kap. 2.2.2.8 beschrieben kultiviert und mit IPTG versetzt. Die weitere Kultivierung erfolgte in der Regel über Nacht bei Raumtemperatur. Vor der Aufarbeitung der Kulturen und Reinigung der Zielproteine wurde die Proteinakkumulation mittels SDS-PAGE (Kap. 2.2.4.7) überprüft. Dazu wurde unmittelbar vor der IPTG-Zugabe sowie nach erfolgter Induktion vor der Ernte der Zellen je 1 ml Kultur entnommen, das Zellpellet entsprechend vorbereitet (Kap. 2.2.2.8) und elektrophoretisch analysiert (Abb. 3.18).



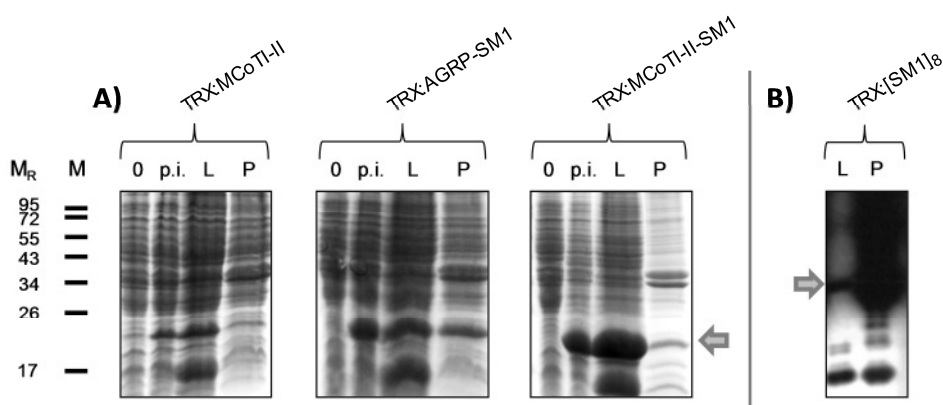
**Abbildung 3.18. SDS-Gelelektrophorese (A) bzw. Immunoblot (B) der uninduzierten (0) und induzierten (p.i.) *E. coli* Origami(DE3).** Es wurde jeweils 1 ml Kultur entnommen, pelletiert, das Zellpellet in 100  $\mu$ l 2 x SDS-Puffer resuspendiert und 10 Minuten bei 95°C erhitzt. Anschließend wurden je 20  $\mu$ l auf ein 18 %-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen; die Elektrophorese erfolgte unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Das Gel wurde schließlich mit kolloidaler Coomassie-Lösung gefärbt (A) bzw. das Protein mit einem gegen den Hexa-Histidin-Rest gerichteten Antikörper detektiert (B).  $M_R$ : Angabe der relativen Molekülmasse  $\times 10^3$ . M: Proteinmarker.

Da die induzierten Kulturen im Coomassie-gefärbten Gel eine zusätzliche Bande im Vergleich zum Proteinbandenmuster der uninduzierten Probe (Abb. 3.18 A) zeigten, also die Proteinakkumulation zufriedenstellend war, konnte das Zellpellet lysiert und zur Reinigung des rekombinanten Proteins mittels IMAC verwendet werden. Die Expression von [SM1]<sub>8</sub> in *E. coli* Origami(DE3) ergab zwar keine so hohe Proteinakkumulation wie bei den übrigen Konstrukten, dennoch wurden die Zellen zur Reinigung der SM1-Variante herangezogen, da Versuche die Proteinexpression zu verbessern erfolglos geblieben waren. Um aber trotzdem zuvor die Anwesenheit des Proteins nachzuweisen, wurde im Anschluss an die SDS-PAGE ein Immunoblot durchgeführt und das [SM1]<sub>8</sub>-Peptid mit einem gegen den Histidin-Rest gerichteten Antikörper detektiert (Abb. 3.18 B).

### 3.1.3.1 Proteinreinigung der CKM-Varianten aus *E. coli* Origami

Um eine ausreichend hohe Ausbeute an rekombinantem Protein zu erzielen, musste vor der Reinigung der Peptide aus *E. coli* ein entsprechend großes Kulturvolumen inokuliert, kultiviert und mit IPTG die Proteinexpression induziert werden. Zur Reinigung der rekombinanten Proteine wurden die Zellen schließlich geerntet und wie unter Kap. 2.2.4.4 beschrieben lysiert. Um eine bessere Löslichkeit der Proteine zu erreichen, wurde dem Ansatz das Detergens CHAPS zugesetzt. Das erhaltene Lysat wurde zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile zuerst zentrifugiert und anschließend über einen Partikelfilter (Durchmesser 0.45  $\mu\text{m}$ ) filtriert.

Um im Vorfeld der Proteinreinigung auszuschließen, dass sich das zu isolierende Protein als unlösliches Einschlusskörperchen im vom Lysat abgetrennten Pellet befindet und so der Reinigung nicht zugänglich wäre, wurden sowohl das Lysat als auch das Pellet zunächst mittels SDS-PAGE auf die Anwesenheit des rekombinanten Proteins getestet. Das nach der Lyse erhaltene Zellpellet wurde dazu dreimal mit 20 mM Tris-Puffer (pH 8.0) gewaschen und anschließend in LEW-Puffer aufgenommen. Jeweils 20  $\mu\text{l}$  der Proben wurden schließlich elektrophoretisch analysiert (Abb. 3.19). Da der Nachweis von bakteriellem TRX:[SM1]<sub>8</sub> zuvor allein durch Anfärben mit Coomassie nicht möglich war (Abb. 3.18 A), wurde hier wiederum ein Immunoblot zur Detektion des Peptids herangezogen (Abb. 3.19 B).

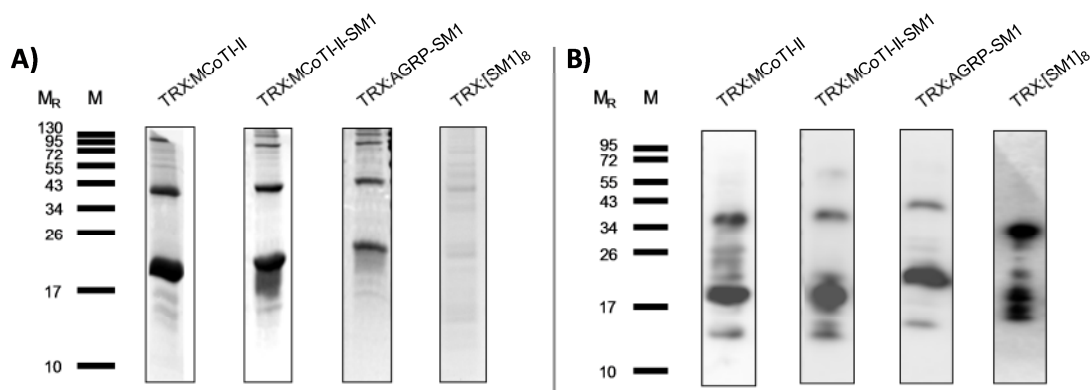


**Abbildung 3.19. SDS-Gelelektrophorese (A) bzw. Immunoblot (B) der uninduzierten (0), induzierten (p.i.) *E. coli* Origami, des Zelllysats und des Zellpellets.** Es wurden je 20  $\mu\text{l}$  auf ein 18 %-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen; die Elektrophorese erfolgte unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Das Gel wurde schließlich mit kolloidaler Coomassie-Lösung gefärbt (A) bzw. das Protein mit einem gegen den Hexa-Histidin-Rest gerichteten Antikörper detektiert (B). Die Proteinbande der oktameren SM1-Peptid-Variante ist mit einem Pfeil markiert.  $M_R$ : Angabe der relativen Molekülmasse  $\times 10^3$ . M: Proteinmarker.

Die Reinigung der Proteine erfolgte schließlich über eine IMAC-Säule unter Verwendung des *Profinia*<sup>TM</sup> Protein Purification Systems der Firma BioRad (Kap. 2.2.4.5). Die Proteinlösung wurde entsalzt und die einzelnen Fraktionen der Reinigung (Durchfluss (FT), Waschschrift 1 (W1), Waschschrift 2 (W2) und Eluat (E)) jeweils in Falcon-Röhrchen aufgefangen, gegebenenfalls

aliquotiert und für spätere Analysen zurückgestellt. Die Konzentration an gereinigtem Protein im Eluat wurde wie gewohnt von dem im System enthaltenen Detektor ermittelt, wobei das Ergebnis gegebenenfalls mittels BCA-Assay überprüft wurde (Kap. 2.2.4.6).

Der Erfolg der Reinigung wurde mittels SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung (Abb. 3.20 A) bzw. Immunodetektion der gereinigten Proteine unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gerichtet gegen den Hexa-Histidin-Rest sichtbar gemacht (Abb. 3.20 B; Kap. 2.2.4).



**Abbildung 3.20. Detektion der gereinigten bakteriell exprimierten Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese (A) bzw. Immunoblot (B).** Es wurden je 20  $\mu$ l (A) bzw. 5  $\mu$ l (B) auf ein 18 %-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen; die Elektrophorese erfolgte unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Das Gel wurde schließlich mit kolloidaler Coomassie-Lösung gefärbt (A) bzw. die Proteine mit einem Antikörper gerichtet gegen den Hexa-Histidin-Rest detektiert (B). M<sub>R</sub>: Angabe der relativen Molekülmasse  $\times 10^3$ . M: Proteinmarker.

Ähnlich wie bei der transienten pflanzlichen Expression der Peptide variierte jedoch auch hier die Ausbeute an isoliertem rekombinantem Protein bei ansonsten konstanten Bedingungen erheblich, wobei dieser Umstand wohl wiederum durch die wiederholte Verwendung der IMAC-Säulen bedingt wurde. Während dabei aber TRX:MCotI-II, TRX:AGRP-SM1 und TRX:MCotI-II-SM1 problemlos zu exprimieren und reinigen waren, gestaltete sich die Reinigung von TRX:[SM1]<sub>8</sub> erheblich schwieriger. Neben einer niedrigen Proteinakkumulationsrate sorgte vor allem die Tatsache für Schwierigkeiten, dass trotz der Verwendung von CHAPS der größte Teil des exprimierten Proteins im Pellet aus Zelltrümmern nach der Lyse und anschließenden Zentrifugation verloren ging. Dieser Umstand konnte jedoch kompensiert werden, indem ein größeres Kulturvolumen (600 ml) angesetzt und aufgereinigt wurde. Dadurch konnte schließlich auch TRX:[SM1]<sub>8</sub> aus *E. coli* Origami gereinigt und neben den anderen Peptiden zu weiteren Applikationen verwendet werden.

Aus 300 ml Kultur konnten dabei etwa zwischen 1 und 9 mg rekombinantes Protein isoliert werden, wobei die entsalzte Proteinlösung nach nur einer Säulenpassage noch Verunreinigungen durch geringe Mengen an bakteriellen Proteinen enthalten konnte. Die Reinheit stand jedoch angesichts der geplanten späteren Applikationen zunächst nicht im Vordergrund.

### 3.1.4 Aktivitätsbestimmung des heterolog exprimierten CKM MCoTI-II mittels Trypsin-Inhibitionstest

Da es sich bei dem Peptid MCoTI-II um einen Inhibitor der Protease Trypsin handelt, konnte ein erster Hinweis auf eine korrekte Faltung und somit auf die Aktivität und Funktionalität der jeweiligen Variante des rekombinanten Proteins über den Nachweis der Inhibition der Trypsinaktivität erfolgen. Dabei haben die MCoTI-II-Varianten mit integriertem SM1-Peptid jedoch ihre inhibitorische Wirksamkeit verloren, da dieses in die Inhibitorschleife des Mikroproteins inseriert wurde.

Zur Bestimmung ihrer inhibitorischen Aktivität wurden die entsprechenden Proteine nach der Reinigung mittels IMAC direkt dem Test auf Trypsin-Inhibition unterzogen und zu diesem Zweck seriell mit Phosphatpuffer verdünnt. Eine Übersicht der untersuchten Varianten liefert Tabelle 3.4.

Tabelle 3.4: Übersicht der dem Test auf Trypsininhibition unterzogenen MCoTI-II-Varianten mit Angabe des zur Produktion verwendeten Expressionssystems.

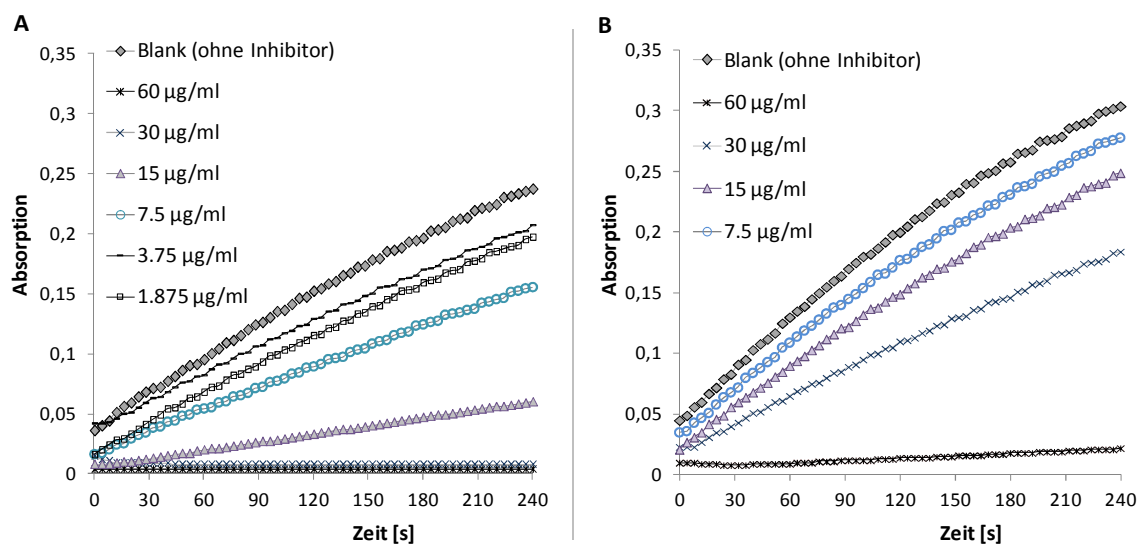
Protein	Expressionssystem	Trypsininhibition
GFP:MCoTI-II	transient, <i>N. benthamiana</i>	möglich
TRX:MCoTI-II	bakteriell, <i>E. coli</i> Origami(DE3)	möglich
MCOTI001	transient, <i>N. benthamiana</i>	möglich
MCOTI002	transient, <i>N. benthamiana</i>	nicht möglich

Die Enzym-Inhibitor-Interaktion konnte durch Messung der Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration (Kap. 2.2.5.2) untersucht werden. Dazu wurde zunächst eine konstante Menge an Trypsin (100  $\mu$ l Trypsinlösung der Konzentration 0.5 bzw. 1 mg/ml) mit den seriell verdünnten Lösungen des inhibitorischen Peptids inkubiert, um die Ausbildung des Enzym-Inhibitor-Komplexes zu gewährleisten. Die verbliebene Enzymaktivität wurde nach Zugabe des synthetischen chromogenen Substrats N-Benzoyl-*D,L*-arginin-p-nitroanilid (BAPNA) durch die Messung des Anstiegs der Absorption bei 405 nm photometrisch bestimmt. Dabei war das Ausmaß der Freisetzung von p-Nitroanilin aus BAPNA durch Trypsin das Maß für die inhibitorische Wirksamkeit der Peptide und wurde über einen Zeitraum von vier Minuten verfolgt. Die Änderung der Absorption wurde anschließend in einem Diagramm gegen die Zeit aufgetragen und aus der Steigung der Geraden der Wert der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit  $v_0$  [ $\Delta A_{405}/\text{min}$ ] ermittelt. Die gemessene Änderung der Absorption pro Minute ( $\Delta A_{405}/\text{min}$ ) ist bei konstanten Bedingungen der (verbleibenden) Trypsinaktivität direkt proportional. Zur Bestimmung der Aktivität des Inhibitors wurde die gemessene Absorptionsänderung pro Minute bzw. die verbleibende Trypsinaktivität in Abhängigkeit von der Konzentration des Inhibitors graphisch

dargestellt. Dabei ist die inhibitorische Aktivität des Peptids umso größer, je niedriger die nötige Konzentration des Inhibitors ist, um bei ansonsten konstanten Bedingungen die Trypsinaktivität um einen definierten Betrag (hier: 50 %) zu reduzieren.

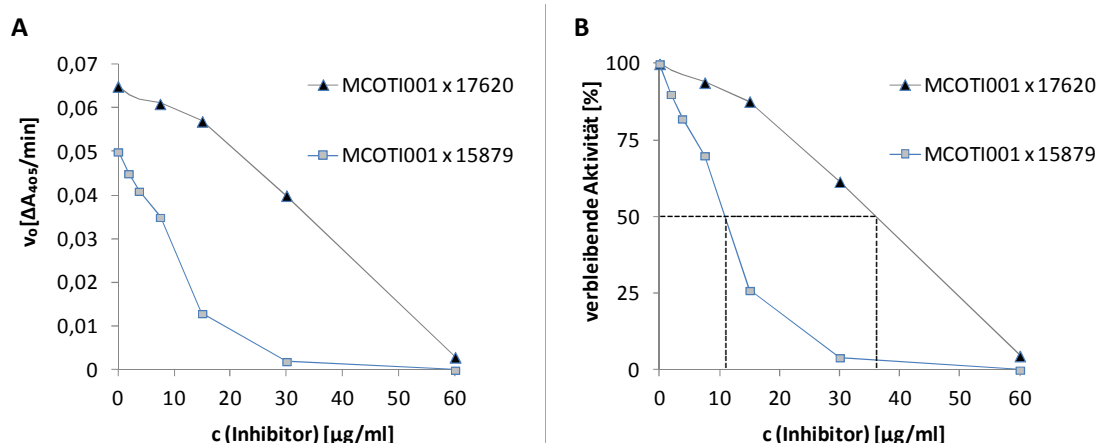
#### 3.1.4.1 Aktivität der pflanzlich exprimierten MCoTI-II-Varianten

Die Untersuchungen zur Trypsininhibition mit MCOTI001 zeigten, dass die pflanzlich in *N. benthamiana* exprimierte Variante des MCoTI-II sowohl nach cytosolischer als auch nach apoplastischer Expression eine Inhibition der Trypsinaktivität aufwies. Dieser Effekt war erwartungsgemäß umso ausgeprägter, je konzentrierter die vermessene Probe war (Abb. 3.21).



**Abbildung 3.21. Messung der Trypsin-inhibitorischen Aktivität von MCOTI001, cytosolisch (A) und apoplastisch exprimiert (B).** Das mittels IMAC gereinigte Protein wurde seriell verdünnt, wobei je 100 µl für die Trypsin-Inhibition eingesetzt wurden. Die Konzentration der verwendeten Trypsinlösung betrug 0,5 mg/ml. Als Substrat wurde BAPNA (5 mM) verwendet.

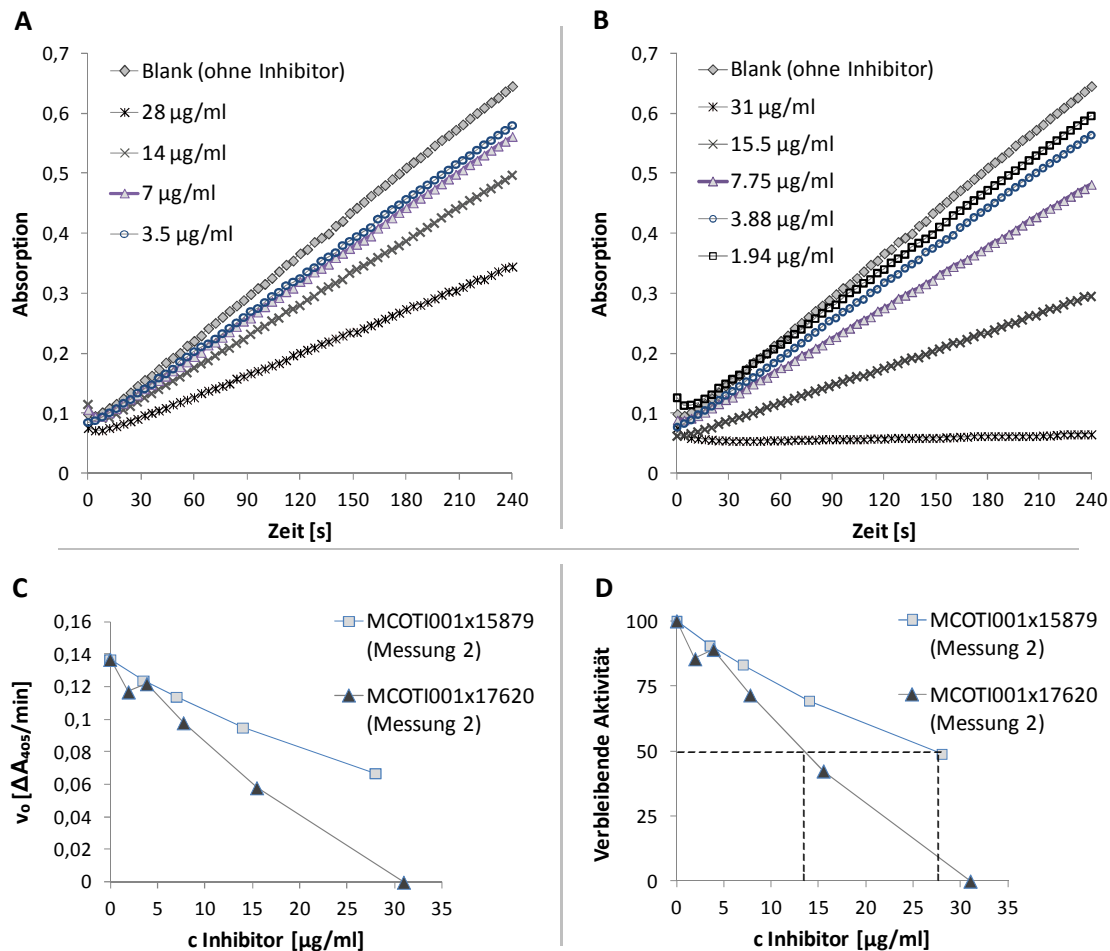
Die Darstellung der Änderung der Absorption bei 405 nm pro Minute ( $\Delta A_{405}/\text{min}$ ) in einem Diagramm gegen die Konzentration des Proteins ermöglichte den direkten Vergleich der inhibitorischen Wirksamkeit zwischen dem im Cytosol und dem im Apoplasten akkumulierten Peptid. Die beiden verschiedenen Zellkompartimente waren hier vor allem hinsichtlich ihres Einflusses auf die Ausbildung von Disulfidbrücken und somit auf die Faltung und Aktivität der akkumulierten Proteine interessant. Die Diagramme zeigten einen deutlich unterschiedlichen Kurvenverlauf, aus dem abgelesen werden konnte, dass eine geringere Menge des im Cytosol akkumulierten Peptids ausreichte, um eine 50 %-ige Reduktion der Trypsinaktivität zu erreichen. Um die gleiche Wirkung mit dem im Apoplasten akkumulierten Peptid erzielen zu können, müsste die Konzentration mehr als verdreifacht werden (Abb. 3.22).



**Abbildung 3.22. Vergleich der inhibitorischen Wirksamkeit von MCOTI001 (A, B), exprimiert in unterschiedlichen Zellkompartimenten von *N. benthamiana*.** Die Darstellung der Änderung der Absorption bei 405 nm pro Minute ( $\Delta A_{405}/\text{min}$ ) in Abhängigkeit von der Inhibitor-Konzentration ermöglicht den direkten Vergleich der inhibitorischen Aktivität zwischen dem im Cytosol und Apoplast akkumulierten Peptid (A). Wird aus  $\Delta A_{405}/\text{min}$  die verbleibende Trypsinaktivität berechnet und in einem Diagramm gegen die Konzentration des inhibitorischen Peptids aufgetragen, so kann jeweils diejenige Inhibitor-Konzentration bestimmt werden, die nötig ist, um die Aktivität des Trypsins um 50 % zu senken (B). MCOTI001 x 17620: apoplastisch exprimierte Variante. MCOTI001 x 15879: cytosolisch exprimierte Variante.

Das Verhalten von MCOTI001 hinsichtlich seiner trypsininhibitorischen Aktivität deutet entgegen der Erwartungen darauf hin, dass hier trotz des reduzierenden Milieus des Cytosols eine biologisch aktive Protein-Konformation entstehen kann. Essentiell dafür ist die korrekte Ausbildung der Disulfidbrücken, die sich prinzipiell nur unter oxidierenden Bedingungen, wie sie außerhalb der Zelle herrschen, bilden können. Eukaryotische Zellen bieten in bestimmten Kompartimenten (Endoplasmatisches Retikulum) partiell oxidierende Bedingungen, wo sich zu sezernierende Proteine falten und Disulfidbrücken ausbilden können. Daher überrascht es zunächst, dass das cytosolisch akkumulierte Peptid eine höhere inhibitorische Aktivität aufweist als das apoplastisch exprimierte.

Um also die Reproduzierbarkeit dieses Ergebnisses zu analysieren, wurde die Messung wiederholt. Dazu wurden erneut *N. benthamiana*-Pflanzen mit den entsprechenden Modulen infiltriert, das Blattmaterial geerntet und anschließend das Protein isoliert. Der Proteingehalt der untersuchten Inhibitorlösungen wurde vor der Messung mittels BCA-Assay (Kap. 2.2.4.6) bestimmt. Die Aktivitätsbestimmung mittels Trypsin-Inhibitionstest erfolgte wie zuvor beschrieben. Abbildung 3.23 zeigt das Ergebnis dieser zweiten vergleichenden Messung der inhibitorischen Aktivität.



**Abbildung 3.23. Wiederholung des Vergleichs der inhibitorischen Wirksamkeit von MCOTI001, exprimiert in unterschiedlichen Zellkompartimenten von *N. benthamiana*.** A) cytosolisch akkumulierte Variante (MCOTI001x15879). B) apoplastisch akkumulierte Variante (MCOTI001x17620). Weitere Erklärungen im Text.

Anders als bei der zuerst durchgeführten Messung (Abb. 3.22) zeigte der direkte Vergleich der trypsininhibitorischen Aktivität hier diesmal eine bessere Wirksamkeit für das im Apoplasten der Pflanze exprimierte Peptid (Abb. 3.23 C, D).

Da sich nun die beiden durchgeführten Messungen lediglich im zur Proteinreinigung verwendeten Blattmaterial unterschieden (verschiedene Infiltrationsereignisse), sollte untersucht werden, inwieweit unterschiedliche Infiltrationsereignisse auch unterschiedlich aktives Protein liefern könnten.

Um diese These zu prüfen und etwaige Fehler bei den Messungen auszuschließen, wurde das Blattmaterial, das für die erste Messung verwendet worden war, erneut zur Reinigung des cytosolisch bzw. apoplastisch exprimierten Proteins herangezogen, um im Anschluss die trypsininhibitorische Wirksamkeit zu überprüfen. Darüber hinaus wurde Blattmaterial eines dritten Infiltrationsereignisses zur Reinigung der Proteine verwendet. Dabei wurden mit allen aus dem

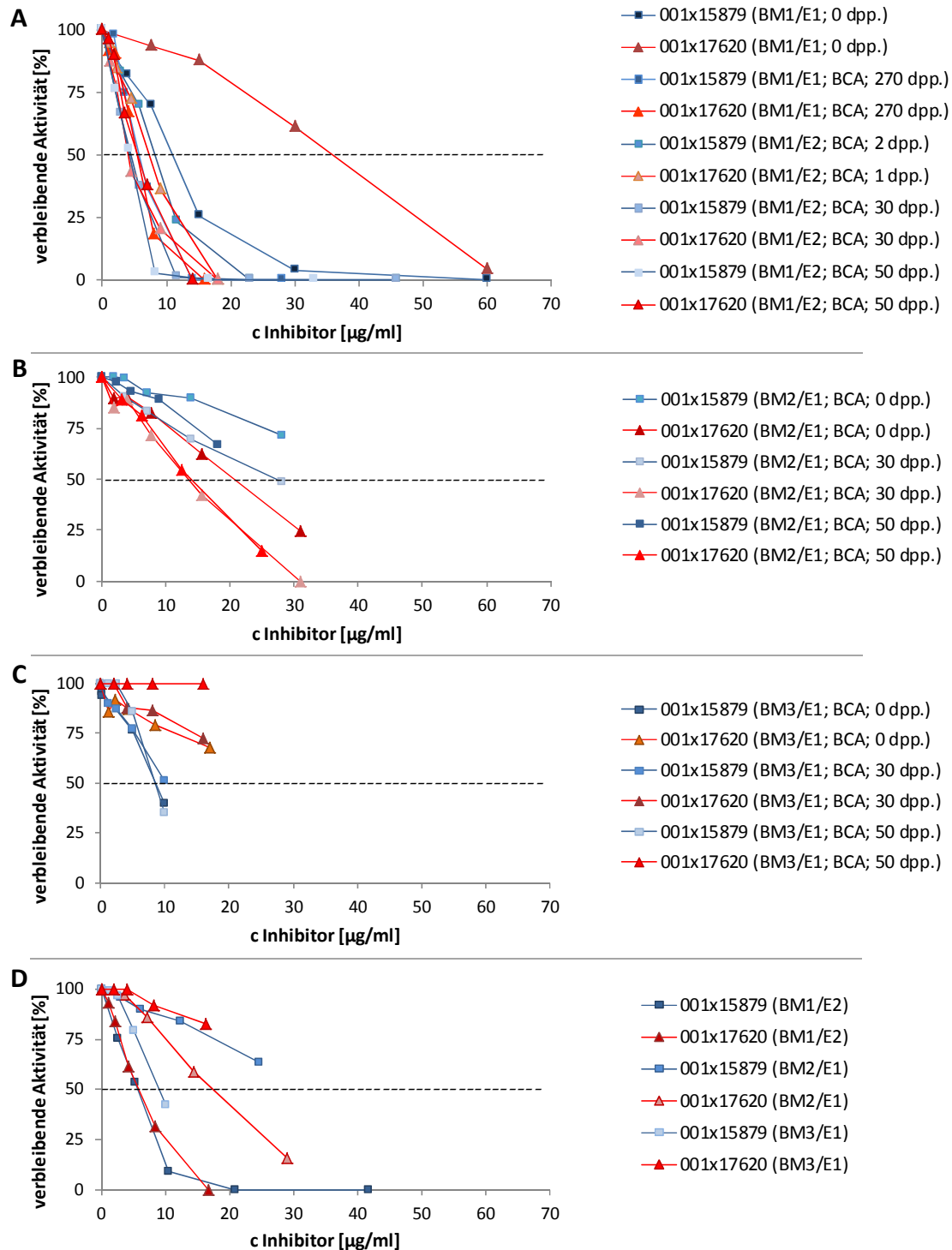


entsprechenden Blattmaterial erhaltenen Proteinlösungen jeweils mehrere Messungen zur Trypsininhibition durchgeführt. Um die einzelnen Messungen und das dabei jeweils verwendete Blattmaterial unterscheiden zu können, wurde eine entsprechende Nomenklatur entwickelt. So wurde Protein aus Blattmaterial (BM) dreier verschiedener Infiltrationsereignisse (BM1, BM2, BM3) isoliert, wobei jeweils sowohl das cytosolisch als auch das apoplastisch akkumulierte Protein aufgereinigt wurde (001x15879 und 001x17620). Wurde das gleiche Blattmaterial mehrmals zur Reinigung verwendet, so erhielten die Eluate die Zusätze „1“ bzw. „2“ (E1, E2). Da nicht nur die Reproduzierbarkeit der Messungen untersucht werden sollte, sondern auch mögliche Einflüsse der Lagerung auf die Proteinlösung, wurden sämtliche Eluate am Tag der Reinigung (0 dpp) bzw. nur kurze Zeit später (1 oder 2 dpp) sowie 30 und 50 Tage danach (30 dpp, 50 dpp) vermessen. Der Proteingehalt der untersuchten Lösungen wurde vor der Messung mittels BCA-Assay bestimmt. Zur Bestimmung der Aktivität des Inhibitors wurden die gemessenen Absorptionsänderungen pro Minute bzw. die verbleibenden Trypsinaktivitäten in Abhängigkeit von der Konzentration des Inhibitors graphisch dargestellt.

Abbildung 3.24 zeigt die Ergebnisse dieser Messungen. Dabei wird deutlich, dass verschiedene Infiltrationsereignisse scheinbar unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der Aktivität der akkumulierten Proteine liefern können. So zeigten die Proben aus dem Blattmaterial des ersten Infiltrationsereignisses für das im Apoplasten akkumulierte Protein etwa die gleiche trypsininhibitorische Aktivität wie das cytosolisch exprimierte Protein (Abb. 3.24 A, D), wohingegen der Unterschied bei Verwendung des Blattmaterials eines zweiten Infiltrationsereignisses ausgeprägter war. Hier weist das im Apoplasten der Pflanzenzelle akkumulierte Protein eine höhere Aktivität im Vergleich zum im Cytosol angereicherten auf (Abb. 3.24 B, D).

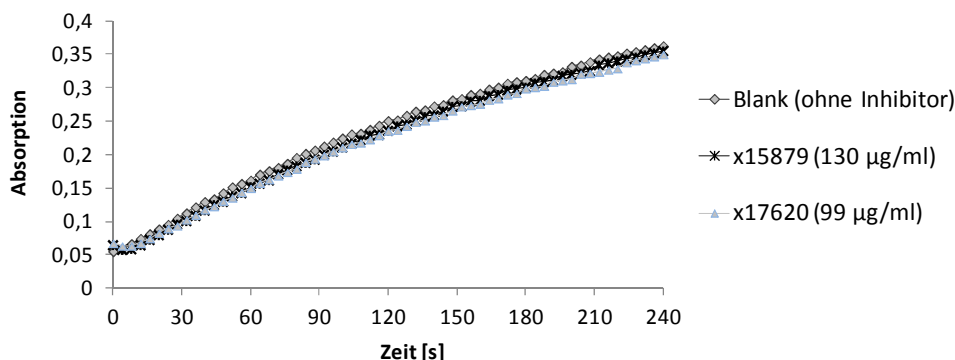
Ein ganz anderes Ergebnis lieferte hingegen der Trypsin-Inhibitionstest unter Verwendung des Blattmaterials eines dritten Infiltrationsereignisses. Hier zeigte die cytosolisch exprimierte gegenüber der apoplastisch exprimierten MCoTI-II-Variante eine höhere trypsininhibitorische Aktivität (Abb. 3.24 C, D).

Zusammenfassend konnte jedoch gezeigt werden, dass auch die Expression im Cytosol zumindest zu einem bestimmten Anteil biologisch aktives Protein liefern kann. Die Dauer der Lagerung scheint sich insgesamt nicht auf die Aktivität der Probe auszuwirken. Abbildung 3.24 D zeigt die jeweils gemittelten Werte der Ergebnisse der einzelnen Messungen.



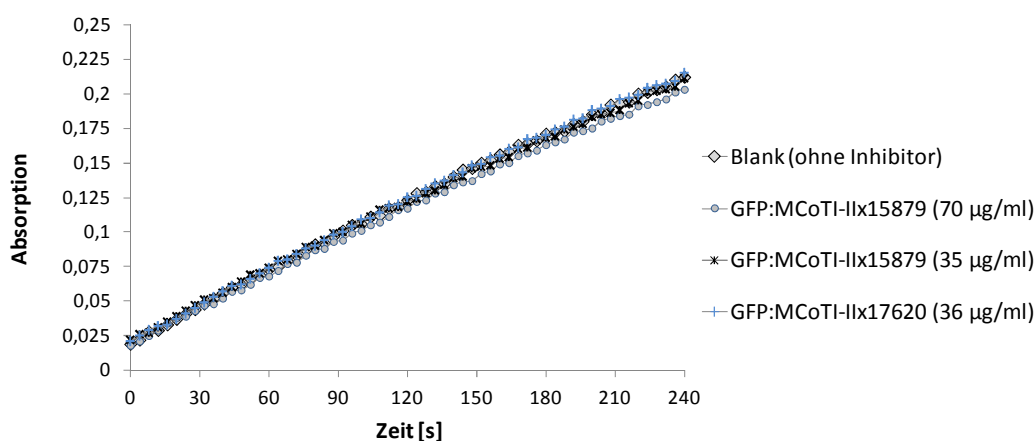
**Abbildung 3.24. Vergleich der trypsininhibitorischen Aktivität von MCOT1001 verschiedener Infiltrationsereignisse.** Die Expression erfolgte transient in *N. benthamiana* unter Verwendung des 5'-Moduls pICH15879 (Cytosol-Targeting; 001x15879) bzw. des 5'-Moduls pICH17620 (ER-/Apoplast-Targeting; 001x17620). Die Konzentration der verwendeten Trypsinlösung betrug 0.5 mg/ml. Als Substrat wurde BAPNA (5 mM) verwendet. Weitere Erklärungen im Text.

Das Peptid MCOTI002, das durch die Integration des SM1-Peptids in die Inhibitorschleife des MCoTI-II seine inhibitorische Aktivität verloren haben sollte, wurde in einem weiteren Test exemplarisch für alle anderen Varianten mit integriertem SM1-Peptid hinsichtlich seiner Wirksamkeit überprüft. Eine Inhibition der Trypsinaktivität konnte hier erwartungsgemäß nicht beobachtet werden (Abb. 3.25).



**Abbildung 3.25. Graphische Darstellung der Änderung der Absorption in Abhängigkeit von der Zeit für den Test auf trypsininhibitorische Aktivität von MCOTI002.** Die Expression erfolgte transient in *N. benthamiana* unter Verwendung des 5'-Moduls pICH15879 (Cytosol-Targeting) bzw. des 5'-Moduls pICH17620 (ER-/Apoplast-Targeting). Die Konzentration der verwendeten Trypsinlösung betrug 1 mg/ml. Als Substrat wurde BAPNA (5 mM) verwendet. Die Änderung der Absorption wurde bei 405 nm über einen Zeitraum von 4 Minuten verfolgt.

Die Messungen zur inhibitorischen Wirksamkeit der pflanzlich als GFP-Fusion exprimierten Variante von MCoTI-II ergaben weder für das im Cytosol noch für das im Apoplasten akkumulierte Protein eine inhibitorische Aktivität (Abb. 3.26).

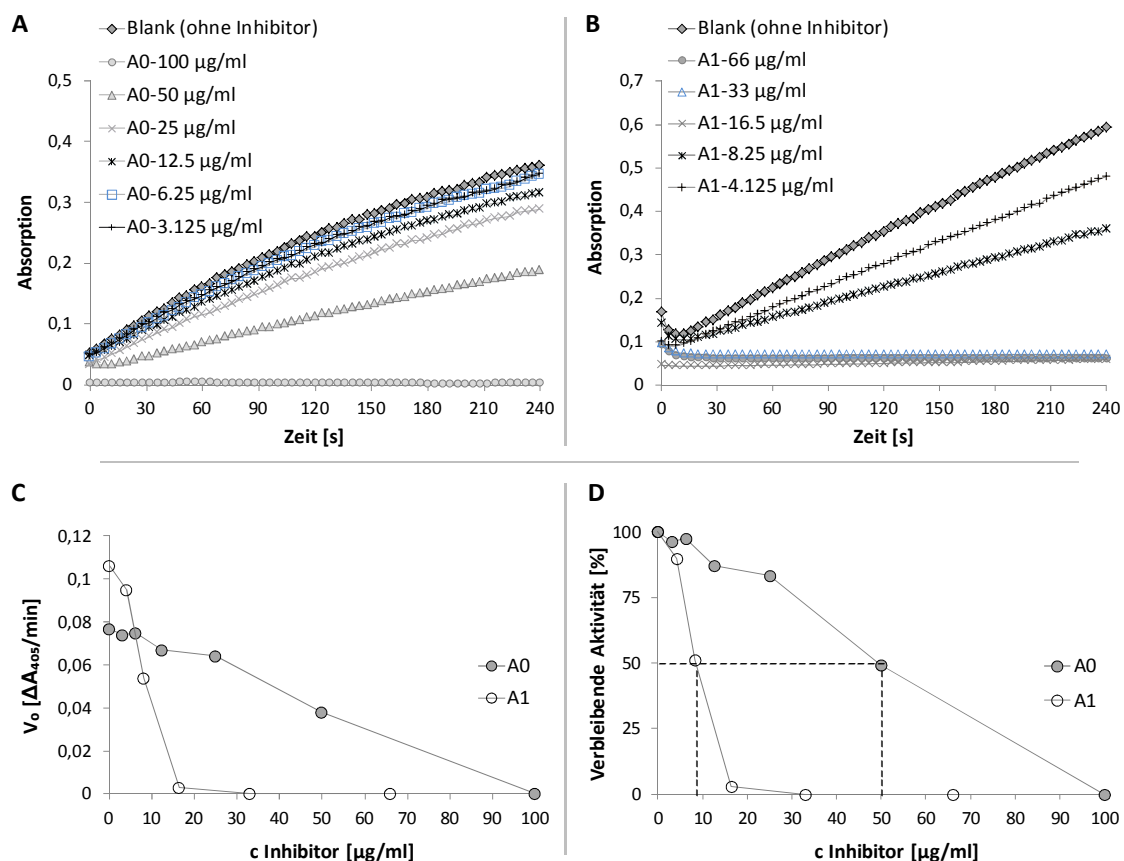


**Abbildung 3.26. Messung der Trypsin-inhibitorischen Aktivität von GFP: MCoTI-II, cytosolisch und apoplastisch exprimiert.** Die Expression erfolgte transient in *N. benthamiana* unter Verwendung des 5'-Moduls pICH15879 (Cytosol-Targeting) bzw. des 5'-Moduls pICH17620 (ER-/Apoplast-Targeting). Die Konzentration der verwendeten Trypsinlösung betrug 0.5 mg/ml. Als Substrat wurde BAPNA (5 mM) verwendet. Die Änderung der Absorption wurde bei 405 nm über einen Zeitraum von 4 Minuten verfolgt.

Dabei ist jedoch zu beachten, dass der Anteil des inhibitorischen CKM an der Gesamtproteinmasse durch den großen Fusionspartner GFP nur sehr gering ist und daher vergleichsweise wesentlich größere Mengen Protein zur Bestimmung der inhibitorischen Aktivität des MCoTI-II eingesetzt werden müssten.

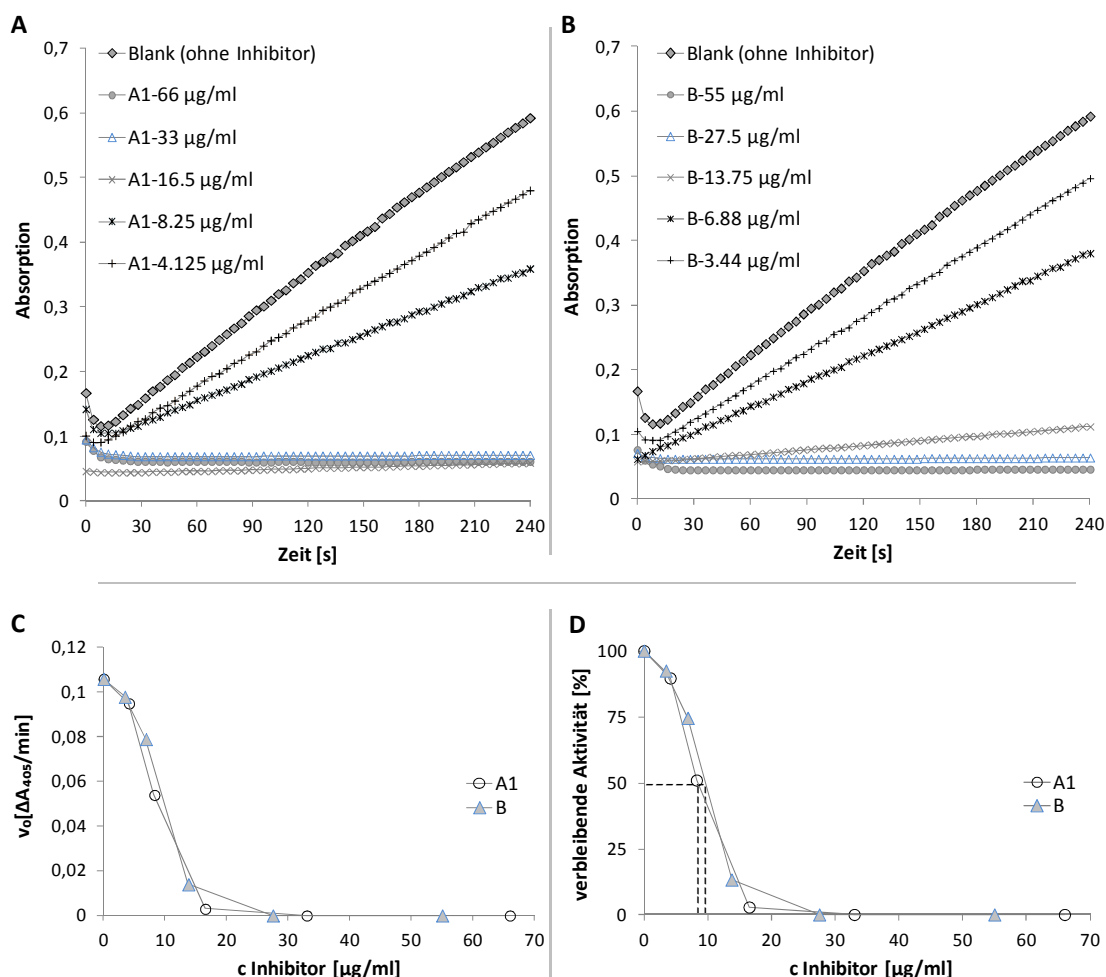
### 3.1.4.2 Aktivität der bakteriell exprimierten MCoTI-II-Variante

Zugleich wurde auch die bakteriell in *E. coli* Origami(DE3) exprimierte Variante des MCoTI-II auf ihre Aktivität der Inhibition von Trypsin untersucht (Abb. 3.27). Durch die Verwendung des pET-32-Expressionsvektors handelte es sich bei dieser Variante um ein Fusionsprotein von MCoTI-II mit Thioredoxin. Dabei sollte durch die Verwendung eines *trxB/gor*-mutanten Expressionswirtes außerdem die Ausbildung der Disulfidbrücken im bakteriellen Cytoplasma und dadurch die Produktion von aktivem Protein begünstigt werden.



**Abbildung 3.27. Messung der Trypsin-Inhibition von MCoTI-II bakteriell exprimiert und gereinigt als Thioredoxin-Fusion aus *E. coli* Origami(DE3).** Das gereinigte Protein wurde seriell verdünnt, wobei je 100 µl der Verdünnungen für die Messungen verwendet wurden. A) Die Konzentration der verwendeten Trypsinlösung betrug 1,0 mg/ml. B) Die Konzentration der verwendeten Trypsinlösung betrug 0,5 mg/ml; die Konzentration der untersuchten Proteinlösung wurde vor der Messung mittels BCA-Assay bestimmt. Die Darstellung der Änderung der Absorption bei 405 nm pro Minute ( $\Delta A_{405}/\text{min}$ ; C) bzw. der verbleibenden Trypsinaktivität (D) in Abhängigkeit von der Inhibitor-Konzentration ermöglicht den direkten Vergleich der inhibitorischen Aktivität. Als Substrat wurde BAPNA (5 mM) verwendet. Weitere Erklärungen im Text.

Auch hier wurde direkt im Anschluss an die Proteinreinigung mittels IMAC die inhibitorische Aktivität des Fusionsproteins in verschiedenen Verdünnungen gemessen (Messung „A0“; Abb. 3.27 A). Die graphische Darstellung der ermittelten Absorption gegen die Zeit (Abb. 3.27 A) zeigte auch für das bakteriell exprimierte Peptid eine inhibitorische Wirksamkeit gegenüber Trypsin, wobei diese erwartungsgemäß wiederum umso ausgeprägter war, je konzentrierter die vermessene Probelösung war. Zur Bestätigung des zuvor gewonnenen Resultates wurde die Messung unter Verwendung desselben Eluates wiederholt, wobei vor der Messung der Proteingehalt der Lösung mittels BCA-Assay bestimmt (Messung „A1“) und die Konzentration der verwendeten Trypsin-Lösung mit 0.5 mg/ml niedriger gewählt wurde (Abb. 3.27 B). Da die Ergebnisse der beiden Messungen jedoch aufgrund der unterschiedlichen Reaktionsbedingungen stark voneinander abwichen (Abb. 3.27 C, D), wurde eine dritte Messung durchgeführt (Messung „B“; Abb. 3.28 B).

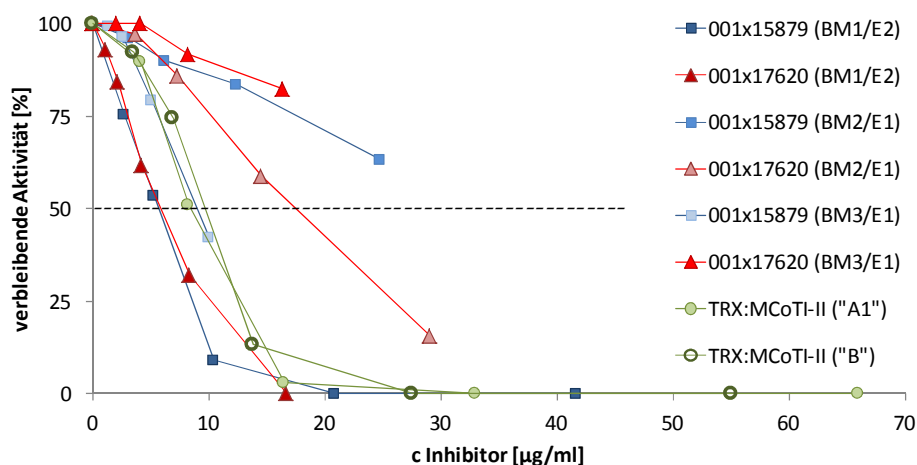


**Abbildung 3.28. Messung der Trypsin-Inhibition von MCoTI-II bakteriell exprimiert und gereinigt als Thioredoxin-Fusion aus *E. coli* Origami(DE3).** Das gereinigte Protein wurde seriell verdünnt, wobei je 100 µl der Verdünnungen für die Messungen verwendet wurden. Als Substrat wurde BAPNA (5 mM) verwendet. Weitere Erklärungen im Text.

Das Protein wurde dazu zunächst erneut produziert, gereinigt und die Konzentration der erhaltenen Proteinlösung mittels BCA-Assay bestimmt. Die Konzentration der verwendeten Trypsinlösung betrug wiederum 0.5 mg/ml.

Abbildung 3.28 zeigt, dass in zwei voneinander völlig unabhängigen Experimenten (Messung „A1“ und Messung „B“; Abb. 3.28 C und D) bei konstanten Bedingungen ein nahezu identisches Ergebnis erzielt werden konnte. Damit konnte auch für das aus *E. coli* gewonnene Peptid eine trypsininhibitorische Aktivität nachgewiesen werden.

Um desweiteren abzuschätzen wie hoch die trypsininhibitorische Aktivität der bakteriell exprimierten Variante im Vergleich zu dem transient in *N. benthamiana* produzierten Protein ist, wurde hier ebenso die verbliebene Trypsinaktivität aus der Änderung der Absorption pro Minute ( $\Delta A_{405}/\text{min}$ ) berechnet und in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration zusammen mit den Kurven für das cytosolisch und apoplastisch exprimierte Peptid graphisch dargestellt. Im direkten Vergleich mit der pflanzlich exprimierten Variante zeigte das bakteriell exprimierte MCoTI-II insgesamt eine etwa gleich gute inhibitorische Aktivität (Abb. 3.29).



**Abbildung 3.29. Vergleich der Trypsin-inhibitorischen Aktivitäten von TRX:MCoTI-II und MCoTI001.** Die Darstellung der verbleibenden Trypsinaktivität in Abhängigkeit von der Inhibitor-Konzentration ermöglicht den direkten Vergleich der inhibitorischen Aktivität zwischen dem bakteriell exprimierten (A1, B) und dem im Cytosol (001x15879) und Apoplast (001x17620) akkumulierten Peptid MCoTI-II. Weitere Erklärungen im Text.

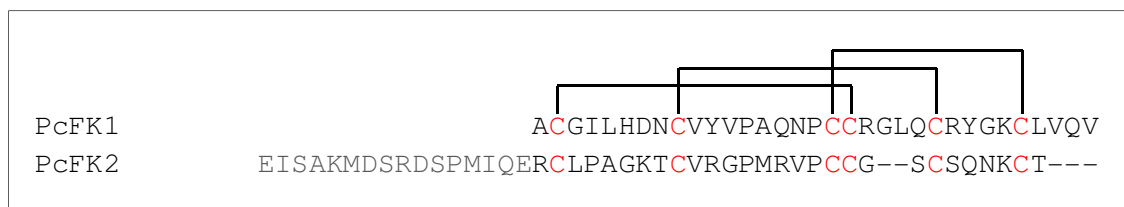
Da es sich hierbei jedoch um ein Fusionsprotein handelt, dessen Masse zu einem erheblichen Anteil durch den Fusionspartner Thioredoxin bestimmt wird, ist ein direkter Vergleich mit dem aus *N. benthamiana* gewonnenen Protein nur bedingt möglich und eigentlich eine niedrigere trypsininhibitorische Aktivität zu erwarten. Darüber hinaus ist die Ausbildung von Disulfidbrücken und damit die korrekte Faltung zu aktivem, löslichem Protein im reduzierenden Cytoplasma von *E. coli* eigentlich nicht möglich. Allein die Wahl des Expressionsstammes und -vektors

(Origami(DE3), pET-32a(+)) wirken sich hier günstig auf die Bildung von Disulfidbrücken im *E. coli*-Cytoplasma aus und führen scheinbar zu einer ausreichend hohen Menge an aktivem Protein.

Die Messungen zur Trypsininhibition der verschiedenen Varianten des CKM MCoTI-II bildeten nach dem Nachweis der Aktivität der exprimierten Peptide die Basis für weitere Untersuchungen, da durch den Nachweis der trypsininhibitorischen Aktivität für alle - außer der großen GFP-Fusion - exprimierten Varianten von MCoTI-II Rückschlüsse auf eine korrekte Faltung zu biologisch aktivem Protein gezogen werden konnten.

### 3.2 Heterologe Expression und Analyse von Psalmopeotoxin I und -II, antiplasmodialer Peptide aus dem Toxin von *Psalmopoeus cambridgei*

Spinnentoxine bestehen, wie andere tierische Toxine auch, aus einer Vielzahl unterschiedlichster Komponenten mit verschiedensten Wirkspektren. Damit bieten sie ein schier unerschöpfliches Reservoir an Molekülen, was sie zu interessanten Werkzeugen bei der Suche nach neuen Angriffspunkten verschiedener Krankheiten und Infektionskrankheiten macht. Ebenso können sie sich bei der Erforschung der Malaria und der Entwicklung neuer Wirkstoffe als nützlich erweisen (Choi *et al.*, 2004). So zeigten die beiden Peptide aus dem Gift der Tarantel *Psalmopoeus cambridgei* *in vitro* starke antiplasmodiale Wirksamkeit gegen die intra-erythrozytären Stadien von *Plasmodium falciparum* (Choi *et al.*, 2004; Pimentel *et al.*, 2006). Dabei wiesen sie keine Toxizität gegenüber den Wirtszellen auf. Psalmopeotoxin I und -II (PcFK1 und -2, *Psalmopoeus cambridgei* *falciparum* Killer 1 und -2; Abb. 3.30) besitzen beide drei Disulfidbrücken und gehören zur Inhibitor Cystin-Knoten (ICK)-Superfamilie (Pimentel *et al.*, 2006). Psalmopeotoxin I besitzt bestimmte Strukturen, wie sie für an Ionenkanälen wirkende Neurotoxine bekannt sind, inhibiert jedoch nicht die neuromuskuläre Funktion (Choi *et al.*, 2004). Gleichzeitig sind der molekulare Angriffspunkt und Wirkmechanismus nicht bekannt, wobei die Wirksamkeit von PcFK1 und PcFK2 aber durchaus durch die Beeinflussung von Ionenkanälen bedingt sein könnte (Choi *et al.*, 2004; Pimentel *et al.*, 2006).



**Abbildung 3.30. Vergleichende Darstellung der Aminosäuresequenzen von PcFK1 und PcFK2.** Die Disulfidbrückenbindungen sind als Linien dargestellt, die Cysteinreste rot hervorgehoben. Die Klonierung von PcFK2 erfolgte einschließlich des Propeptids (grau). Darstellung verändert nach Choi *et al.*, 2004.

Diese Eigenschaften machen die beiden Peptide zu interessanten Kandidaten bei der Suche und Entwicklung neuer antiplasmodialer Wirkstoffe. Im Rahmen dieser Arbeit sollten diese beiden Peptide neben dem oben beschriebenen SM1-Peptid als weitere inhibitorische Kandidatenproteine kloniert, exprimiert und gereinigt werden, um in Fütterungsexperimenten an *Anopheles stephensi* den inhibitorischen Effekt der Peptide auf *Plasmodium berghei* untersuchen zu können. Dabei wurden wiederum verschiedene Expressionssysteme gewählt. So sollte neben der bakteriellen heterologen Expression unter Verwendung des pET-Systems die Produktion der Proteine auch transient als GFP-Fusion in *N. benthamiana* mit dem von der Firma *ICON Genetics* entwickelten viralen System erfolgen. Dabei bietet das transiente System die Vorteile eines

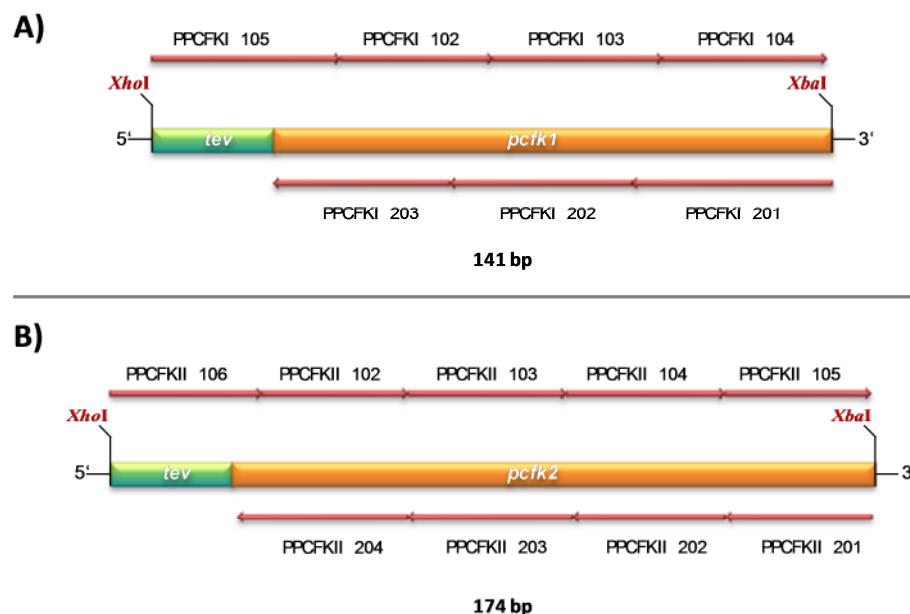


pflanzlichen Expressionssystemen (vergleiche Kap. 1.5) ohne jedoch langwieriger Regenerationsphasen zu bedürfen. So kann dieses System auch als Indikator bezüglich der Funktionalität der produzierten Proteine für die stabile und wesentlich aufwendigere Transformation von *Ricinus communis* dienen. Die stabile Expression in *Ricinus communis* sollte, ebenso wie für die SM1-Peptid-Varianten auch, unter der Kontrolle des Phloem-spezifischen *SUC2*-Promotors aus *Arabidopsis thaliana* (*AtSUC2*) parallel dazu stattfinden (Kap. 3.5).

Abbildung 3.30 zeigt die Aminosäuresequenzen von PcFK1 (UniProt. *accession number*: P0C201) und PcFK2 (UniProt. *accession number*: P0C202).

### 3.2.1 Klonierung der *pcf*k-Varianten

Zur Amplifizierung und Klonierung der gewünschten Konstrukte wurden aus den Sequenzen von *pcf*k1 und *pcf*k2 die Primer *PPCFK1* 102, -103, -104, und -105, *PPCFK1* 201, -202, -203 sowie *PPCFKII* 102, -103, -104, -105, -106, *PPCFKII* 201, -202, -203 und -204 (Tab. 2.6) abgeleitet. Diese wurden dabei so gewählt, dass die Sequenzen von *pcf*k1 und *pcf*k2 allein unter Verwendung der o. g. Primer mittels PCR amplifiziert werden konnten. Zudem wurden die Sequenzen derart modifiziert, dass N-terminal eine *Xho*I-Erkennungssequenz sowie eine TEV-Protease-Schnittstelle, C-terminal die Restriktionsschnittstelle für *Xba*I an die kodierende Sequenz angefügt wurden (Abb. 3.31).



**Abbildung 3.31. Schematische Darstellung der *pcf*k1- (A) und *pcf*k2-Variante (B) sowie der verwendeten Primer.** Die Sequenzen der Primer sind Tabelle 2.6 zu entnehmen. Hier wurden N-terminal die Restriktionsschnittstelle für *Xho*I sowie eine TEV-Protease-Schnittstelle an die kodierende Sequenz angefügt. C-terminal erfolgte die Addition einer Restriktionsschnittstelle für *Xba*I. Diese Modifikationen erlauben die Klonierung in den Vektor pGFP-6121 und die transiente Expression als Fusion mit GFP in *N. benthamiana*. Die Einführung einer TEV-Protease-Schnittstelle ermöglicht die Abspaltung der Hexa-Histidin:GFP-Fusion im Anschluss an die Affinitätsreinigung.

Die Amplifikation erfolgte mittels PCR unter gleichzeitiger Verwendung von *Pfu*- und *Taq*-Polymerase. Dies ermöglichte die Amplifikation der Fragmente mit hoher Lesegenauigkeit (*Pfu*-Polymerase) und darüber hinaus die Addition eines 3'A-Überhangs (*Taq*-Polymerase), wodurch nach der Amplifikation die Ligation in die Klonierungsvektoren pGEM®-T Easy bzw. pCR® 2.1 ermöglicht wurde. Die Ligationsansätze wurden zur Transformation von *E. coli* TOP10 verwendet, wobei das Ergebnis der Transformation mittels PCR unter Verwendung der Primer *PPCFKI 105* und *PPCFKI 201*, sowie *PPCFKII 106* und *PPCFKII 201* (Tab. 2.6) überprüft wurde. Positive Klone wurden in LB-Medium kultiviert. Nach der Isolation der Plasmide wurden diese zur Kontrolle der Anwesenheit des Inserts mit den Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *XbaI* inkubiert. Klone, die nach elektrophoretischer Trennung ein entsprechendes Bandenmuster aufwiesen, wurden sequenziert.

Nach der Verifizierung der Nukleotidsequenz wurden die entsprechenden Fragmente mittels *XhoI/XbaI*-Restriktion isoliert und in den mit *XhoI* und *XbaI* linearisierten Expressionsvektor pGFP-6121 ligiert (Kap. 3.1.1.1; Abb. 3.3). Daraus resultierten die Plasmide pGFP:PcFK1-6121 und pGFP:PcFK2-6121. Diese wurden wie zuvor beschrieben in *E. coli* TOP10 propagiert und nach der Identifikation geeigneter Klone zur Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 und transienten Proteinexpression von PcFK1 und PcFK2 als GFP-Fusion in *Nicotiana benthamiana* verwendet.

Um die Peptide PcFK1 und PcFK2 jedoch nicht nur in *N. benthamiana*, sondern auch in *E. coli* exprimieren zu können, wurden die Plasmide als Vorlagen in einer weiteren PCR verwendet, wobei mittels der entsprechenden Primer die Erkennungssequenzen für *NcoI* und *HindIII* an die kodierende Sequenz von *pcf1* bzw. *pcf2* angefügt wurden. So entstanden im Rahmen einer Diplomarbeit (Tan Thanh Huynh, 2009) die Plasmide pET-32a(+)-TEV-PcFK1 und pET-32a(+)-TEV-PcFK2, die im Anschluss zur Verfügung gestellt wurden. Die Plasmide pET-32a(+)-TEV-PcFK1 und pET-32a(+)-TEV-PcFK2 wurden zur Vervielfältigung zur Transformation von *E. coli* TOP10 verwendet und im Folgenden als Plasmide pPcFK1-2711 und pPcFK2-2711 bezeichnet. Diese dienten anschließend zur Transformation von *E. coli* Origami(DE3), welche nach der Induktion mit 1 mM IPTG schließlich zur bakteriellen Proteinexpression von TRX:PcFK1 und TRX:PcFK2 verwendet wurden.

### 3.2.2 Transiente Expression von GFP:PcFK1 und -2 in *N. benthamiana*

Analog zu den SM1-Peptid-Varianten (Kap. 3.1.2) sollten auch die Varianten der PcFKs wegen der Möglichkeit der schnellen Generierung und Verfügbarkeit der rekombinanten Proteine unter Verwendung des Systems von *ICON Genetics* transient in *Nicotiana benthamiana* exprimiert werden. Mit der Verwendung der 5'-Pro-Vektor-Module pICH15879 und pICH17620 sollte hier abermals eine Akkumulation der Zielproteine im Cytosol bzw. im Apoplasten der Pflanze erreicht werden. Eine Übersicht der Module mit Angabe der relativen Molekülmasse liefert Tabelle 3.5.

Tabelle 3.5: Konstrukte für die transiente Expression in *N. benthamiana* mit Angabe der zu erwartenden relativen Molekülmasse.

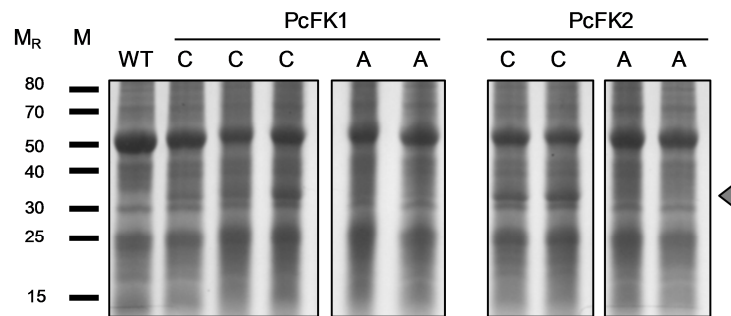
3'-Module	Vektor	Koinfiltration mit 5'-Modulen	Relative Molekülmasse ( $M_R$ )
<b>GFP:PcFK1-6121</b>	pICH10990	pICH15879 / pICH17620	$\sim 33 \times 10^3$
<b>GFP:PcFK2-6121</b>	pICH10990	pICH15879 / pICH17620	$\sim 34 \times 10^3$

Die beiden Varianten wurden wie zuvor beschrieben (Kap. 3.2.1) kloniert und in *A. tumefaciens* GV3101 transformiert. Zur Infiltration von *Nicotiana benthamiana* wurden alle entsprechenden Pro-Vektor-Module und das Rekombinationsmodul über Nacht kultiviert, die Zellen anschließend pelletiert und in *ICON*-Puffer aufgenommen. Schließlich wurden die einzelnen Module zu gleichen Teilen gemischt und in die Stomata der *N. benthamiana*-Pflanzen infiltriert. Eine schematische Darstellung der verwendeten Pro-Vektor-Module kann Abbildung 3.11 in Kap. 3.1.2 entnommen werden.

### 3.2.2.1 Charakterisierung infiltrierter Pflanzen und Nachweis der Proteinsynthese

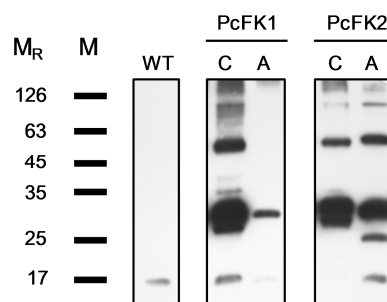
Da auch hier, wie bereits zuvor erläutert (Kap. 3.1.2), die Vitalität der infiltrierten *N. benthamiana*-Pflanzen sowohl innerhalb einer Pflanzenpopulation als auch zwischen den verschiedenen Infiltrationsereignissen stark variierte, wurde der Zeitpunkt der Ernte des infiltrierten Blattmaterials maßgeblich von der Vitalität der Pflanzen bestimmt. Die Akkumulation an rekombinantem Protein konnte vor der Ernte des Blattmaterials unter UV-Licht durch die Eigenfluoreszenz des Fusionspartners (GFP) detektiert werden. Die Blätter wurden nach der Ernte unter flüssigem Stickstoff fein zermörsert und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^\circ\text{C}$  bzw.  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

Der Nachweis der Proteinakkumulation im geernteten Blattmaterial erfolgte mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot mit anschließender Immunodetektion unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gerichtet gegen den GFP- bzw. den Hexa-Histidin-Rest (Kap. 2.2.4.11). Im mit kolloidaler Coomassie-Lösung gefärbten PA-Gel ist das cytosolisch exprimierte Protein im Vergleich zum Proteinbandenmuster des *N. benthamiana*-Wildtyps als eine zusätzliche Bande zu erkennen und daher für dieses die Proteinakkumulationsrate offensichtlich höher als für die apoplastisch exprimierten Varianten (Abb. 3.32).



**Abbildung 3.32. Bis-Tris-Polyacrylamidgele des infiltrierten *N. benthamiana*-Blattmaterials verschiedener Infiltrationsereignisse.** Aufgetragen wurden je 10 µl des Gesamtproteinextrakts von 100 mg Blattmaterial von Pflanzen, die mit den 3'-Modulen jeweils in Kombination mit dem 5'-Modul pICH15879 und pICH17620 infiltriert worden waren. Die Gele wurden mit kolloidaler Coomassie-Lösung gefärbt. Die entsprechenden Proteinbanden sind mit einem Pfeil markiert. C: Koinfiltration des 3'-Moduls mit pICH15879 (Akkumulation des Targetproteins im Cytosol); A: Koinfiltration des 3'-Moduls mit pICH17620 (Akkumulation des Targetproteins im Apoplasten); WT: *N. benthamiana* Wildtyp; M: Proteinmarker;  $M_R$ : Angabe der relativen Molekülmasse  $\times 10^3$ .

Zur weiteren Charakterisierung erfolgte der Nachweis der rekombinanten Proteine mittels Immunodetektion. Dabei konnten sowohl die im Cytosol als auch die im Apoplasten akkumulierten rekombinanten Proteine detektiert werden, wobei hier erwartungsgemäß die cytosolische Expression eine etwas größere Menge Protein lieferte (Abb. 3.33).



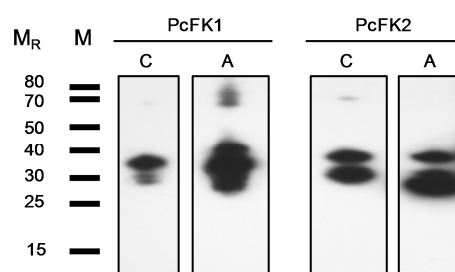
**Abbildung 3.33. Detektion der transient exprimierten Proteine im Gesamtproteinextrakt mittels Immunoblot.** Aufgetragen wurden je 10 µl des Gesamtproteinextrakts aus je 100 mg Blattmaterial. Die Detektion erfolgte mit einem gegen den Hexa-Histidin-Rest gerichteten Antikörper. Exposition des Films: 1 Minute.  $M_R$ : Angabe der relativen Molekülmasse  $\times 10^3$ . M: Proteinmarker. WT: *N. benthamiana* Wildtyp. C: Koinfiltration des 3'-Moduls mit pICH15879 (Akkumulation des Targetproteins im Cytosol); A: Koinfiltration des 3'-Moduls mit pICH17620 (Akkumulation des Targetproteins im Apoplasten).

### 3.2.2.2 Proteinreinigung der PcFK-Varianten aus *N. benthamiana*-Blattmaterial

Nachdem die Proteinakkumulation im *N. benthamiana*-Blattmaterial nachgewiesen werden konnte, erfolgte die Reinigung der rekombinanten Proteine über eine IMAC-Säule unter Verwendung des *Profinia*<sup>TM</sup> Protein Purification Systems von BioRad. Dazu wurden 10 bis 15 g

pulverisiertes Blattmaterial wie zuvor beschrieben aufgearbeitet (Kap. 2.2.4.1) und der filtrierte Extrakt zur Reinigung der rekombinanten Proteine verwendet, wobei das Eluat anschließend entsalzt wurde (Kap. 2.2.4.3). Die einzelnen Fraktionen der Reinigung (Durchfluss (FT), Waschschrift 1 (W1), Waschschrift 2 (W2) und Eluat (E)) wurden in Falcon-Röhrchen aufgefangen, aliquotiert und für spätere Analysen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die vom Detektor des *Profinia*<sup>TM</sup>-Systems ermittelte Konzentration an rekombinantem Protein im Eluat wurde gegebenenfalls mittels BCA-Assay überprüft.

Zur Erfolgskontrolle der Reinigung wurden die Eluatfraktionen der rekombinanten Proteine einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließender Immunodetektion unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers unterzogen (Abb. 3.34).



**Abbildung 3.34. Immunoblot der Eluatfraktionen der transient exprimierten GFP:PcFK-Varianten.** Es wurden je  $5\ \mu\text{l}$  der Eluatfraktion auf ein Bis-Tris-PA-Gel aufgetragen und die Proteine anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Detektion erfolgte mit einem gegen den Hexa-Histidin-Rest gerichteten Antikörper. Exposition des Films: 1 Minute.  $M_R$ : Angabe der relativen Molekülmasse  $\times 10^3$ . M: Proteinmarker. C: Koinfiltration des 3'-Moduls mit pICH15879 (Akkumulation des Targetproteins im Cytosol); A: Koinfiltration des 3'-Moduls mit pICH17620 (Akkumulation des Targetproteins im Apoplasten).

Wie Abbildung 3.34 zeigt, konnten aus dem infiltrierten Blattmaterial die beiden PcFK-Varianten gereinigt werden, wobei die verschiedenen Infiltrationsereignisse sehr unterschiedliche Proteinakkumulationsraten aufwiesen und dieser Umstand erwartungsgemäß den Erfolg der Reinigung stark beeinflusste. Daher variierten die erhaltenen Mengen an isoliertem rekombinantem Protein erheblich. Zudem verringerte sich die Ausbeute an gereinigtem Protein in Abhängigkeit von der Bindekapazität der IMAC-Säule, wenn diese mehrfach verwendet wurde (vergleiche Kap. 3.1.2.2). Dennoch konnten aus 10 g Blattmaterial bis zu 2 mg rekombinantes Protein gereinigt werden, wobei das Ergebnis der Reinigung für die cytosolisch exprimierten Proteine zumeist als besser zu bewerten war. Die Reinheit der erhaltenen Proteinlösungen spielte angesichts der geplanten Applikationen nur eine untergeordnete Rolle und wurde daher nicht optimiert. Die transient exprimierten PcFK-Varianten standen schließlich als GFP-Fusionsproteine für die weitere Anwendung zur Verfügung. Eine Abspaltung des Fusionspartners wurde nicht vorgenommen.

### 3.2.3 Bakterielle Expression von PcFK1 und -2 in *E. coli*

Wie zuvor für die SM1-Peptid-Varianten beschrieben, so galt auch für PcFK1 und PcFK2 eine für Fütterungsexperimente mit *Anopheles stephensi* ausreichende Menge an rekombinantem Protein zu erhalten, um neben der bereits bekannten inhibitorischen Wirkung der beiden Proteine auf die intra-erythrozytären Stadien von *Plasmodium* ggf. einen zusätzlichen inhibitorischen Effekt auf die Entwicklung des Erregers innerhalb des Vektors aufzudecken.

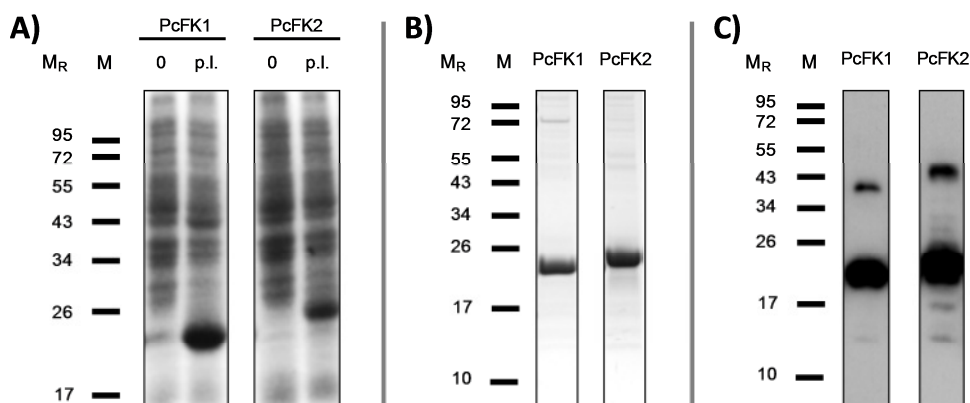
Obwohl mit dem verwendeten transienten pflanzlichen Expressionssystem rekombinantes Protein erhalten wurde und auch für die Untersuchungen mit *Anopheles* verwendet werden sollte, konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die hierfür eingesetzten Konzentrationen an Inhibitor angesichts der Verwendung als GFP-Fusionsprotein von vornherein zu gering sein könnten. Daher sollte als Alternative zum pflanzlichen Expressionssystem unter Verwendung einer mit GFP fusionierten Variante die Expression auch in *E. coli* Origami(DE3) erfolgen, wobei die beiden PcFK-Varianten diesmal als etwas kleinere Thioredoxin-Fusion erhalten wurden.

Die verschiedenen Varianten wurden wie zuvor erläutert (Kap. 3.2.1) unter Verwendung des bakteriellen Expressionsvektors pET-32a(+) kloniert und in *E. coli* Origami(DE3) transformiert (Tabelle 3.6). Die Verwendung des Expressionsvektors pET-32a(+) und die damit verbundene Expression als N-terminale Thioredoxin-Fusion sollte die Ausbildung der Disulfidbrücken der Zielproteine begünstigen und zu biologisch aktivem Protein führen.

Tabelle 3.6: Konstrukte für die bakterielle Expression mit Angabe der zu erwartenden relativen Molekülmasse.

Konstrukt	Vektor	Nomenklatur	Relative Molekülmasse ( $M_R$ )
<b>PcFK1</b>	pET-32a(+)	pPcFK1-2711	$\sim 22 \times 10^3$
<b>PcFK2</b>	pET-32a(+)	pPcFK2-2711	$\sim 23 \times 10^3$

Zur Induktion der Proteinexpression wurden 300 ml LB-Medium versetzt mit den entsprechenden Antibiotika mit einer *E. coli*-Kultur inokuliert und wie in Kap. 2.2.2.8 beschrieben weiter verfahren. Vor der Aufarbeitung der Kulturen und Reinigung der Zielproteine wurde die Proteinakkumulation mittels SDS-PAGE überprüft (Kap. 2.2.4.7). Da die induzierten Proben jeweils eine zusätzliche Bande im Vergleich zum Proteinbandenmuster der uninduzierten Probe zeigten (Abb. 3.35 A), wurden die geernteten Zellen lysiert und die rekombinanten Proteine mittels IMAC gereinigt (Kap. 2.2.4.5; Abb. 3.35 B, C).



**Abbildung 3.35. PA-Gelelektrophorese (A, B) bzw. Immunoblot (C) der uninduzierten (0) und induzierten (p.i.) *E. coli* Origami(DE3) und der gereinigten Proteine.** A) Es wurde jeweils 1 ml Kultur pelletiert, in 100  $\mu$ l 2 x SDS-Puffer resuspendiert und 10 Minuten bei 95°C erhitzt. Anschließend wurden je 20  $\mu$ l auf ein 12 %-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen; die Elektrophorese erfolgte unter nicht-reduzierenden Bedingungen, die Färbung mit kolloider Coomassie-Lösung. B) Es wurden jeweils 20  $\mu$ l des gereinigten Proteins auf ein Bis-Tris-Gel aufgetragen; die Elektrophorese erfolgte unter reduzierenden Bedingungen, die Färbung mit kolloider Coomassie-Lösung. C) Es wurden jeweils 20  $\mu$ l des gereinigten Proteins auf ein Bis-Tris-Gel aufgetragen; die Elektrophorese erfolgte unter reduzierenden Bedingungen, die Detektion der gereinigten Proteine erfolgte mit einem gegen den Hexa-Histidin-Rest gerichteten Antikörper.  $M_R$ : Angabe der relativen Molekülmasse  $\times 10^3$ . M: Proteinmarker. 0: vor der Induktion. p.i.: nach der Induktion.

### 3.2.3.1 Proteinreinigung der Peptide aus *E. coli* Origami

Die Lyse der Zellen erfolgte wie zuvor beschrieben (Kap. 2.2.4.4), wobei das erhaltene Lysat zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile zunächst zentrifugiert und nachfolgend über einen Partikelfilter (0,45  $\mu$ m) filtriert wurde. Anschließend wurden die Proteine über eine IMAC-Säule unter Verwendung des *Profinia*<sup>TM</sup> Protein Purification Systems der Firma BioRad gereinigt. Die erhaltene Proteinlösung wurde entsalzt und die einzelnen Fraktionen der Reinigung (Durchfluss (FT), Waschschrift 1 (W1), Waschschrift 2 (W2) und Eluat (E)) in Falcon-Röhrchen aufgefangen, aliquotiert und für spätere Analysen bei -20°C gelagert. Die vom Detektor des Systems ermittelte Proteinkonzentration im gereinigten Eluat wurde gegebenenfalls mittels BCA-Assay überprüft (Kap. 2.2.4.6). Der Erfolg der Proteinreinigung wurde schließlich mittels SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung bzw. Immunodetektion der rekombinanten Proteine sichtbar gemacht (Abb. 3.35 B und C).

Aus 300 ml Kultur konnten dabei zwischen 6 und 7 mg rekombinantes Protein isoliert werden, wobei die entsalzte Proteinlösung noch eine geringe Menge an Verunreinigungen durch bakterielle Proteine enthalten konnte. Da dies aber für die weitere Anwendung in Fütterungsexperimenten mit *Anopheles* unerheblich war, wurden die erhaltenen rekombinanten Proteine in dieser Form weiterverwendet. Ebenso wurde angesichts der zu erwartenden Einbuße der im Fütterungsversuch applizierbaren Proteinmenge von einer Abspaltung des Fusionspartners Thioredoxin abgesehen.

### 3.3 Heterologe Expression und Analyse von *Plasmodium* TRAP und *Anopheles* Saglin

Das von den Sporozoiten exprimierte *thrombospondin-related anonymous protein* (TRAP) ist in allen *Plasmodium*-Arten konserviert (Robson *et al.*, 1988) und dabei essentiell für die Gleitbewegung der Sporozoiten, die Zellinvasion sowie die Infektiosität *in vivo* (Sultan *et al.*, 2001; Sultan *et al.*, 1997).

TRAP ist ein Typ-I-Transmembranprotein, wobei der extrazelluläre Teil zwei konservierte adhäsive Domänen besitzt: die von Willebrand Faktor A-Domäne, kurz „A-Domäne“ (Girma *et al.*, 1987; Whittaker & Hynes, 2002), und den *thrombospondin type I repeat*, kurz TSR (Lawler & Hynes, 1986; Tucker, 2004). Die A-Domäne besitzt ein konserviertes Motiv, das als *metal ion-dependent adhesion site* (MIDAS) bezeichnet wird. Dieses vermittelt die Liganden-Bindung und ist damit essentiell für die Invasion der Sporozoiten in die Speicheldrüse (Lee *et al.*, 1995; Michishita *et al.*, 1993). Es konnte gezeigt werden, dass Sporozoiten mit einer mutierten A-Domäne in ihrer Fähigkeit der Speicheldrüseninvasion beeinträchtigt waren, was darauf hindeutet, dass die A-Domäne an der Erkennung bzw. Bindung von Rezeptormolekülen der Speicheldrüse beteiligt ist (Wengelnik *et al.*, 1999; Matuschewski *et al.*, 2002). Die Moleküle dieser Interaktion sind jedoch noch weitestgehend unbekannt (James, 2003).

Allerdings generierten Brennan *et al.* im Jahr 2000 einen monoklonalen Antikörper gerichtet gegen ein 100 kDa großes Speicheldrüsen-Protein von *Anopheles*, mit dem die Invasion der Sporozoiten von *Plasmodium* in die Speicheldrüse effektiv inhibiert werden konnte (Brennan *et al.*, 2000). Okulate *et al.* identifizierten später das Target dieses Antikörpers, das Protein Saglin (Okulate *et al.*, 2007). In nachfolgenden Experimenten konnte das Speicheldrüsenprotein Saglin als der Rezeptor sowohl für das SM1-Peptid als auch für die A-Domäne des TRAP identifiziert werden, wobei es sich bei dem SM1-Peptid um ein konformationelles Mimotop der *Plasmodium* TRAP-A-Domäne handelt (Ghosh *et al.*, 2009). Die Ausschaltung der Saglin-Expression und die Blockade des Saglin durch o. g. Antikörper führten wiederum zu einer starken Inhibierung der Speicheldrüseninvasion durch die Sporozoiten (Ghosh *et al.*, 2009; vergleiche Kap. 1.4.2).

Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass diese beiden Proteine entscheidend für die Invasion der Speicheldrüse und damit für die Übertragung der Malaria sind (Ghosh *et al.*, 2009). Daher sollten die A-Domäne des TRAP als plasmodiales Antigen sowie das Saglin als Zielstruktur in *Anopheles* heterolog im bakteriellen Expressionssystem bzw. transient in *Nicotiana benthamiana* mit dem von der Firma *ICON Genetics* (Halle/Saale) entwickelten viralen System produziert werden. Dies sollte die Grundlage für weitere Arbeiten wie die Identifikation bindender Strukturen unter Verwendung einer Phagenbibliothek bilden, wobei diese bindenden Proteine als antiplasmodiale Antikörperfragmente wiederum in Pflanzen (wie z. B. *Ricinus communis*) exprimiert werden könnten.

Je nach Anwendung wurden daher verschiedene Varianten generiert. Tabelle 3.7 liefert eine Übersicht der erzeugten Konstrukte.



Tabelle 3.7: Übersicht der verwendeten Vektoren und generierten Konstrukte mit Angabe der Nomenklatur und der zu erwartenden relativen Molekülmasse der Varianten.

Konstrukt	Vektor	Nomenklatur	Relative Molekülmasse ( $M_R$ )
<b>PbTRAP-Ado</b>	pQE60	pPbTRAP-Ado-2111	$\sim 25 \times 10^3$
	pET-32a(+)	pPbTRAP-Ado-2711	$\sim 42 \times 10^3$
	pET-28a(+)	pPbTRAP-Ado-2511	$\sim 25 \times 10^3$
	pICH11599	pPbTRAP-Ado-6321	$\sim 25 \times 10^3$
<b>Saglin</b>	pET-32a(+)	pSaglin_syn-2712	$\sim 65 \times 10^3$
	pET-28a(+)	pSaglin_syn-2512	$\sim 47 \times 10^3$
	pICH11599	pSaglin_syn-6322	$\sim 47 \times 10^3$

### 3.3.1 Klonierung der A-Domäne des *Plasmodium berghei* Thrombospondin Related Adhesive Protein (TRAP)

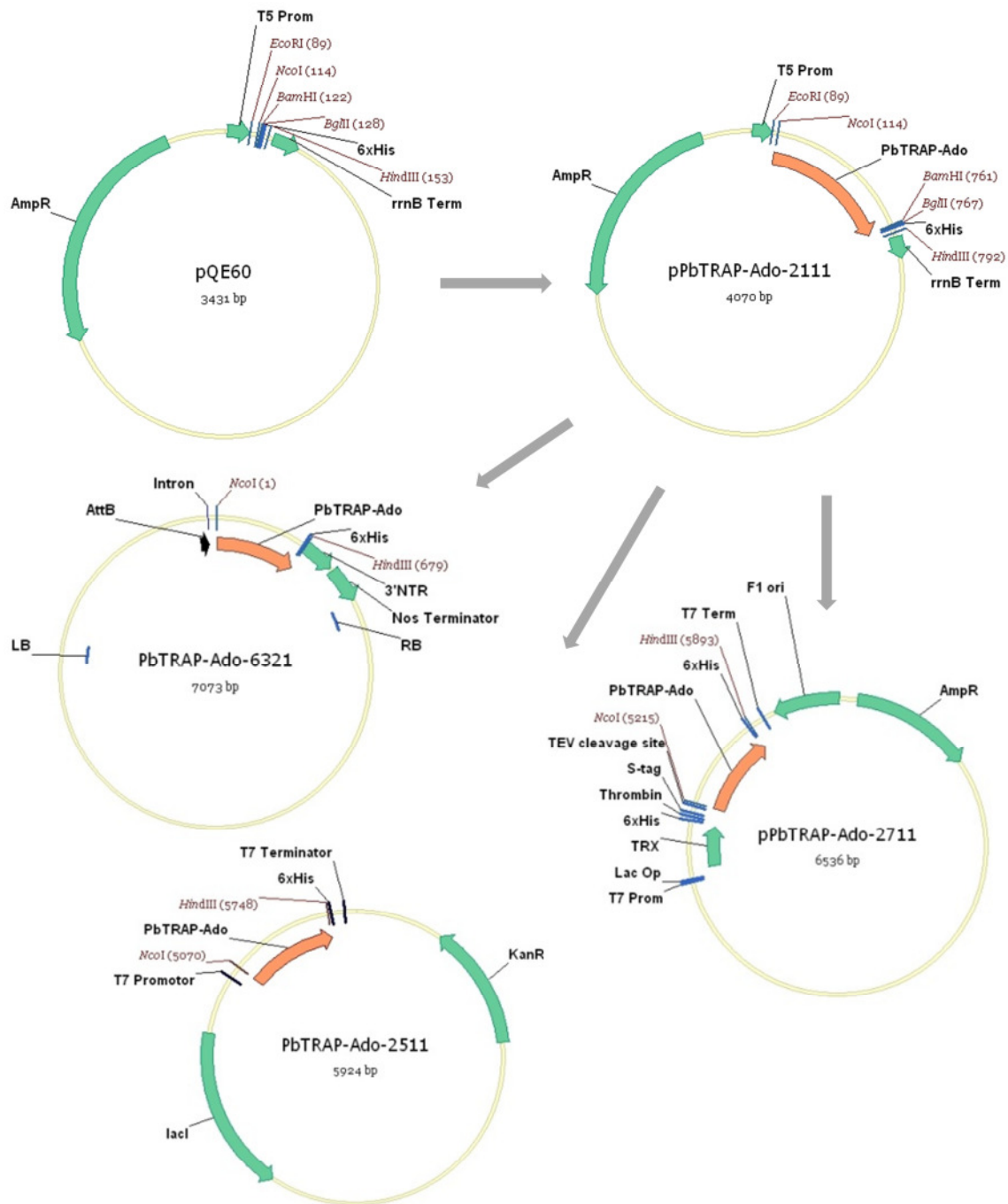
Die Generierung der A-Domäne des *Plasmodium berghei* TRAP erfolgte in Anlehnung an Jethwaney *et al.* (Jethwaney *et al.*, 2005).

Zur Amplifikation der A-Domäne wurde genomische DNA des Stammes NK65 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Kai Matuschewski, Berlin) als Vorlage in einer PCR eingesetzt. Dabei wurde unter Verwendung der Primer *PPbTRAPAdo for* und *-rev* (Tab. 2.6) ein etwa 700 bp großes Fragment kodierend für die A-Domäne (*residues* 84 bis 725) erzeugt, an das N-terminal die Restriktionsschnittstelle für *NcoI*, C-terminal eine Restriktionsschnittstelle für *BamHI* angefügt wurden. Diese Modifikationen sollten im Folgenden die Ligation in den bakteriellen Expressionsvektor pQE60 (Qiagen) und dadurch eine C-terminale Fusion der kodierenden Sequenz der A-Domäne mit einem Hexa-Histidin-Rest ermöglichen.

Das PCR-Produkt wurde zunächst in den Klonierungsvektor pCR2.1 ligiert und der Ligationsansatz zur Transformation kompetenter *E. coli* TOP10 verwendet. Nach der Identifizierung positiver Klone wurde das Plasmid isoliert und zur Verifizierung der korrekten Nukleotidsequenz sequenziert. Anschließend wurde nach einem Restriktionsverdau mit den Enzymen *NcoI* und *BamHI* das entsprechende Fragment in den Expressionsvektor pQE60 ligiert. Daraus resultierte das Plasmid pPbTRAPAdo-2111, das nach der Transformation von *E. coli* M15 (Kap. 2.1.6) zur bakteriellen Expression der TRAP-A-Domäne verwendet werden konnte.

Um zugleich das pET-System als zusätzliches bakterielles Expressionssystem nutzen zu können, wurde aus dem Konstrukt pPbTRAPAdo-2111 mittels Restriktionsverdau die TRAP-A-Domäne als *NcoI/HindIII*-Fragment isoliert und in die Vektoren pET-32a(+) und pET-28a(+) ligiert. Dadurch entstanden die Plasmide pPbTRAPAdo-2711 und pPbTRAP-Ado-2511, die zur Transformation von *E. coli* Origami(DE3) bzw. *E. coli* BL21(DE3) und bakteriellen Proteinexpression dienen (Abb. 3.36). Durch die Verwendung von pET-32a(+) war es möglich, das Zielprotein als Fusion

mit Thioredoxin zu exprimieren und so die korrekte Faltung des Proteins im Cytosol von *E. coli* zu begünstigen.



**Abbildung 3.36. Schematische Darstellung der Klonierung der A-Domäne des *P. berghei* TRAP.** Nach der Insertion als *NcoI/BamHI*-Fragment in den Vektor pQE60 erfolgte die weitere Klonierung als *NcoI/HindIII*-Fragment in die Vektoren pET-28a(+), pET-32a(+) und pICH11599. Daraus resultierten die Plasmide PbTRAP-Ado-2511, -2711, und -6321. Weitere Erklärungen im Text.

Neben der bakteriellen Proteinexpression sollte, analog zu allen übrigen Proteinen, auch die A-Domäne des *P. berghei* TRAP transient in *Nicotiana benthamiana* exprimiert werden und nach einem Vergleich der Expressionssysteme ebenso zu weiteren Anwendungen zur Verfügung stehen. Daher wurde das *NcoI/HindIII*-Fragment der TRAP-A-Domäne aus pPbTRAPAdo-2111 auch zur Ligation in den Vektor pICH11599 (*ICON Genetics*) herangezogen. Das resultierende Plasmid pPbTRAPAdo-6321 wurde zur Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 und transienten Proteinexpression in *Nicotiana benthamiana* verwendet.

Abbildung 3.36 zeigt schematisch das Vorgehen bei der Klonierung der A-Domäne des *P. berghei* TRAP.

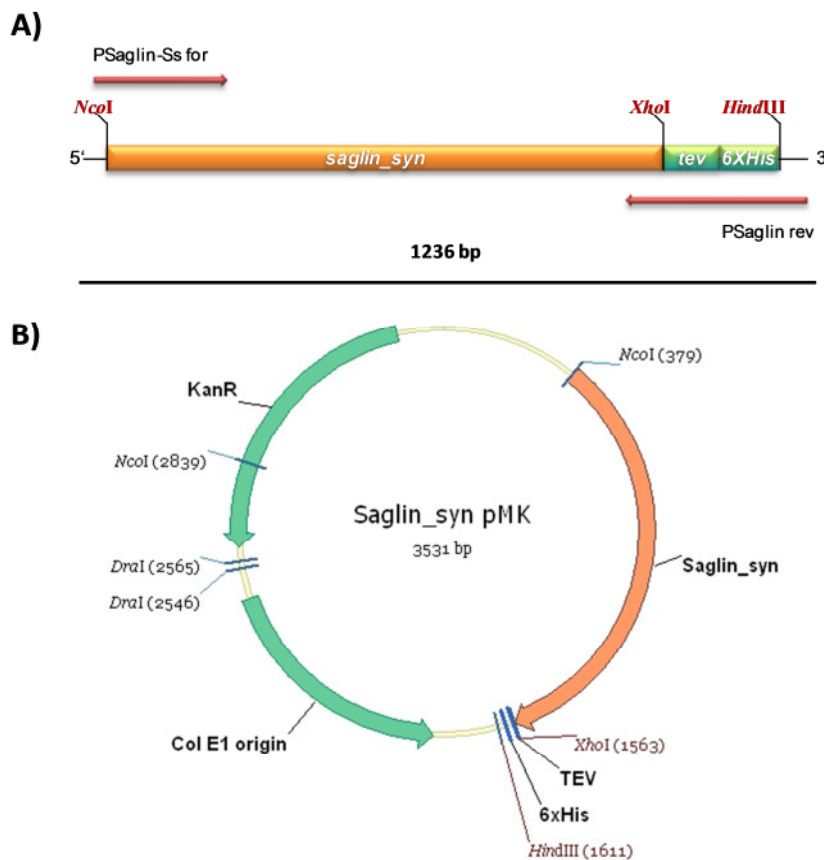
### 3.3.2 Klonierung von *Anopheles* Saglin

Für die Expression des *Anopheles* Speicheldrüsen-Oberflächenproteins Saglin (GenBank accession number AAW31598) wurde eine um die Signalsequenz verkürzte Variante generiert. Dabei wurden an die kodierende Sequenz N-terminal eine Restriktionsschnittstelle für *NcoI*, C-terminal die Restriktionsschnittstellen für *XhoI* und *HindIII* sowie ein Hexa-Histidin-Rest angefügt. Dies sollte die Klonierung sowohl in den *ICON*-Vektor pICH11599 und somit die transiente Expression in *N. benthamiana*, als auch in die bakteriellen Expressionsvektoren pET-32a(+) und pET-28a(+) ermöglichen. Die Einführung einer Erkennungssequenz der TEV-Protease erlaubt die Abspaltung des Hexa-Histidin-Rests im Anschluss an die Affinitätsreinigung. Das Konstrukt wurde von der Firma *Mr. Gene* synthetisiert und als Plasmid Saglin\_syn pMK zur Verfügung gestellt (Abb. 3.37).

Nach der Transformation von *E. coli* TOP10 wurde die kodierende Sequenz als *NcoI/HindIII*-Fragment mittels Restriktionsverdau unter Verwendung des Restriktionsenzym *DraI* isoliert und zur transienten pflanzlichen Expression in den Vektor pICH11599 ligiert. Die Verwendung von *DraI* war erforderlich, da sonst durch die Entstehung gleich großer Fragmente eine Isolierung des *NcoI/HindIII*-Fragmentes unmöglich gewesen wäre. Daraus resultierte das Plasmid pSaglin\_syn-6322, das nach der Transformation von *E. coli* TOP10 und seiner Isolierung mit anschließender Kontrollrestriktion schließlich zur Transformation von *A. tumefaciens* GV3101 eingesetzt wurde. Trotz zahlreicher Versuche konnten jedoch zu keinem Zeitpunkt positive Zellen identifiziert werden. Daher konnte eine transiente pflanzliche Expression des Saglin nicht vorgenommen werden.

Umso wichtiger war demnach die Erzeugung der Konstrukte zur bakteriellen Expression, um schließlich dennoch eine für weitere Applikationen ausreichende Menge des Proteins zu gewinnen. Also wurde die für die Saglin-Variante kodierende Sequenz als *NcoI/HindIII*-Fragment in die bakteriellen Expressionsvektoren pET-32a(+) und pET-28a(+) ligiert, wobei bei der Verwendung von pET-32a(+) wiederum ein N-terminaler Thioredoxin-Rest am Zielprotein eingeführt wurde. Die resultierenden Plasmide pSaglin\_syn-2712 und pSaglin\_syn-2512 wurden

zur Transformation von *E. coli* Origami(DE3) bzw. *E. coli* BL21(DE3) und anschließenden bakteriellen Proteinexpression herangezogen.



**Abbildung 3.37. Schematische Darstellung der *saglin*-Variante.** Die eingefügten Mutationen ermöglichen sowohl die transiente Expression in *N. benthamiana* als auch die bakterielle Expression.

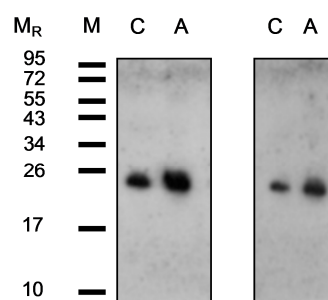
### 3.3.3 Transiente Expression der A-Domäne des *P. berghei* TRAP in *N. benthamiana*

Da für Saglin die Transformation von *A. tumefaciens* GV3101 nicht erfolgreich war, konnte nun lediglich die transiente pflanzliche Expression von PbTRAP-Ado durchgeführt werden. Wie zuvor beschrieben, kann die transiente Expression in *N. benthamiana* mit den Vorteilen der pflanzlichen Proteinexpression in sehr kurzer Zeit eine große Menge Protein liefern (Kap. 1.5.1; Kap. 3.1.2). Das Konstrukt wurde wie zuvor beschrieben kloniert und in *A. tumefaciens* GV3101 transformiert (Kap. 3.3.1). Der Erfolg der Transformation wurde wiederholt mittels PCR unter Verwendung der Primer *PPbTRAPAdo* for und -rev (Tab. 2.6) überprüft. Das 3'-Pro-Vektor-Modul, die 5'-Pro-Vektor-Module pICH15879, pICH17620 sowie das Rekombinationsmodul pICH10881 wurden zur Infiltration von *Nicotiana benthamiana* wie zuvor erläutert über Nacht kultiviert, die Zellen pelletiert und in *ICON*-Puffer aufgenommen (Kap. 2.2.3.4.1). Anschließend wurden die Bakteriensuspensionen der einzelnen Module im Verhältnis 1:1:1 gemischt und in *N.*

*benthamiana* infiltriert. Als Positiv-Kontrolle für die Expression wurde eine Pflanze mit dem für GFP kodierenden 3'-Pro-Vektor-Modul pICH7410 infiltriert.

### 3.3.3.1 Charakterisierung infiltrierter *N. benthamiana*-Pflanzen und Nachweis der Proteinsynthese

In Abhängigkeit von der Vitalität der infiltrierten *N. benthamiana*-Pflanzen wurden diese fünf bis zehn Tage weiter kultiviert und anschließend wie zuvor beschrieben geerntet (Kap. 2.2.3.4.1). Dabei war auch hier eine sehr unterschiedliche Entwicklung der Pflanzen nach der Infiltration zu beobachten (vergleiche Kap. 3.1.2.1), die sich in Nekrosen um die Infiltrationsstelle oder im Welken und Absterben der Pflanzen äußerte. Die Proteinakkumulation wurde mittels SDS-PAGE (Kap. 2.2.4.7) und Western Blot mit anschließender Immunodetektion unter Verwendung eines gegen den Hexa-Histidin-Rest gerichteten Antikörpers (Kap. 2.2.4.11) nachgewiesen. Wurde das Gel des Blattextraktes nach der Elektrophorese mit kolloidaler Coomassie-Lösung gefärbt (Kap. 2.2.4.9), so konnte das akkumulierte Protein durch den Vergleich mit dem Proteinbandenmuster des *N. benthamiana*-Wildtyps nicht als zusätzliche Bande sichtbar gemacht werden. Die Proteinakkumulation konnte daher als relativ gering eingestuft und trotz zahlreicher Infiltrationsereignisse im Rahmen dieser Arbeit auch nicht gesteigert werden. Die Detektion des rekombinanten Proteins im Blattextrakt erfolgte infolgedessen durch einen Immunoblot unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gerichtet gegen den Hexa-Histidin-Rest. So konnte eine Proteinakkumulation im untersuchten Blattmaterial sowohl im Cytosol als auch im Apoplasten nachgewiesen werden (Abb. 3.38). Wie auch bei der transienten Expression der CKM-Varianten schwankte die Akkumulationsrate zwischen den einzelnen Infiltrationsereignissen stark und war in manchen Fällen so gering, dass kein Proteinnachweis möglich war. Insgesamt konnte aber beobachtet werden, dass die Akkumulation rekombinanten Proteins unter Verwendung des 5'-Pro-Vektor-Moduls pICH15879 ohne Targeting-Sequenz (Akkumulation im Cytosol) tendenziell etwas niedriger war als bei Koinfiltration mit dem 5'-Pro-Vektor-Modul pICH17620 mit Apoplast-Targeting-Präsequenz (Abb. 3.38).



**Abbildung 3.38. Immunoblot der transient in *N. benthamiana* exprimierten A-Domäne.** Aufgetragen wurden je 20 µl des Gesamtproteinextrakts aus je 100 mg Blattmaterial, die Detektion erfolgte mit einem gegen den Hexa-Histidin-Rest gerichteten Antikörper.  $M_R$ : Angabe der relativen Molekülmasse  $\times 10^3$ . M: Proteinmarker. C: Koinfiltration des 3'-Moduls mit pICH15879 (Akkumulation des Targetproteins im Cytosol); A: Koinfiltration des 3'-Moduls mit pICH17620 (Akkumulation des Targetproteins im Apoplasten).

### 3.3.3.2 Proteinreinigung der *P. berghei* TRAP-A-Domäne aus *N. benthامiana*

Obwohl die Proteinakkumulation der A-Domäne im *N. benthامiana*-Blattmaterial verhältnismäßig gering war, wurde dennoch die Reinigung des rekombinanten Proteins versucht. Dazu wurde eine ausreichende Menge pulverisiertes Blattmaterial entsprechend aufgearbeitet (Kap. 2.2.4.1), der Rohextrakt wiederholt zentrifugiert und anschließend über eine IMAC-Säule unter Verwendung des *Profinia*<sup>TM</sup> Protein Purification Systems der Firma *BioRad* aufgereinigt, wobei die erhaltene Proteinlösung entsalzt wurde (Kap. 2.2.4.3). Die einzelnen Fraktionen bestehend aus Durchfluss (FT), Waschschrift 1 (W1), Waschschrift 2 (W2) und Eluat (E) wurden jeweils in Falcon-Röhrchen aufgefangen und zur Analyse mittels Immunoblot herangezogen.

Da der Gehalt an rekombinantem Protein im Blattmaterial schon nur sehr gering war, gelang trotz hohem Blattmaterialeinsatz die Reinigung der rekombinanten TRAP-A-Domäne nicht. Das 25 x 10<sup>3</sup> große Protein konnte zu keiner Zeit in der Eluatfraktion der IMAC-Reinigung nachgewiesen werden.

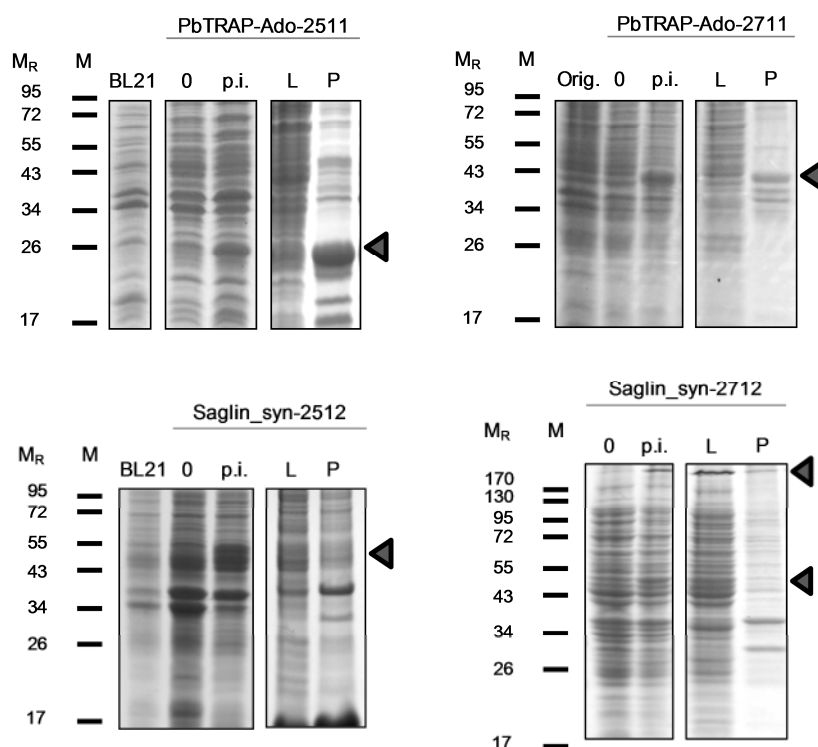
Somit war, wie auch für das *Anopheles* Oberflächenprotein Saglin, die transiente pflanzliche Expression der A-Domäne im Rahmen dieser Arbeit nicht realisierbar und lediglich die bakterielle Expression zur Gewinnung der beiden Proteine möglich.

### 3.3.4 Bakterielle Expression der A-Domäne des *P. berghei* TRAP und des *Anopheles* Oberflächenproteins Saglin

Da eine transiente pflanzliche Expression der Proteine also nicht erreicht werden konnte, konnten zur Gewinnung von Saglin und der *P. berghei* TRAP-A-Domäne im Rahmen dieser Arbeit lediglich die bakteriellen Expressionssysteme verwendet werden. Dafür waren die für die beiden Proteine kodierenden Sequenzen zuvor jeweils in die bakteriellen Expressionsvektoren pET-32a(+) und pET-28a(+) kloniert worden, so dass beide Proteine sowohl mit Thioredoxin als Fusionspartner als auch ohne exprimiert werden konnten. Die Vorteile der Expression als Thioredoxin-Fusion unter Verwendung des Vektors pET-32a(+) wurden zuvor erläutert (Kap. 2.1.8; Kap. 3.1.1).

Die Expression der TRAP-A-Domäne unter Verwendung des pQE-Expressionssystems wurde vernachlässigt, da zuvor das rekombinante Protein mit diesem System nicht oder nur in sehr geringer Menge exprimiert und gereinigt werden konnte (Möller, 2010, Diplomarbeit).

Nach der Transformation von *E. coli* Origami(DE3) (pET-32a(+)) und BL21(DE3) (pET-28a(+)) wurde LB-Medium versetzt mit den entsprechenden Antibiotika mit einer *E. coli*-Kultur inokuliert, wie in Kap. 2.2.2.8 beschrieben kultiviert und zur Induktion der Proteinexpression mit 1 mM IPTG versetzt. Anschließend wurden die Bakterien über Nacht bei Raumtemperatur weiter kultiviert. Zur Überprüfung einer ausreichenden Proteinakkumulation wurde eine kleine Teilmenge unmittelbar vor der IPTG-Zugabe sowie nach erfolgter Induktion vor der weiteren Aufarbeitung der Kulturen zur Reinigung der rekombinanten Proteine entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert (Kap. 2.2.2.8; Kap. 2.2.4.7, Abb. 3.39).



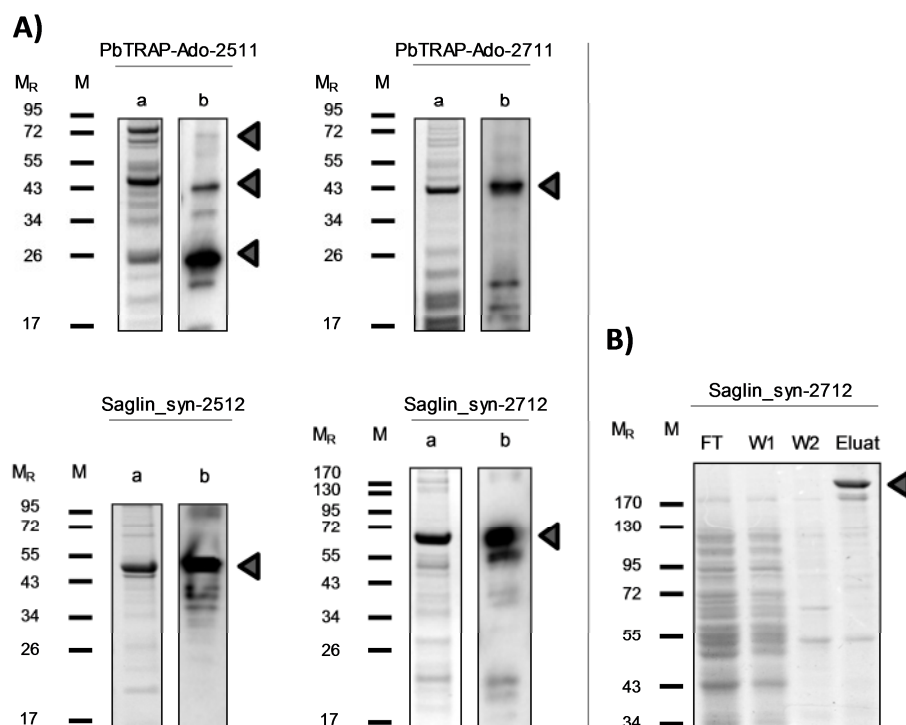
**Abbildung 3.39. Elektrophoretische Analyse der Expression der A-Domäne und des Saglin in *E. coli*.** PA-Gelelektrophorese der uninduzierten (0), der induzierten (p.i.) Zellen, des Zelllysats (L) und des Zellpellets (P). Es wurden je 25  $\mu$ l Probe auf ein 12-15 %-iges SDS-PA-Gel aufgetragen, anschließend wurde das Gel mit kolloidaler Coomassie-Lösung gefärbt.  $M_R$ : Angabe der relativen Molekülmasse  $\times 10^3$ . M: Proteinmarker. BL21: *E. coli* BL21(DE3) Wildtyp. Orig.: *E. coli* Origami(DE3) Wildtyp. Rekombinantes Protein bzw. seine Oligomere sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Weitere Erklärungen im Text.

Da die induzierten Zellen (p. i.) im Coomassie-gefärbten Gel jeweils eine zwar recht schwache, aber doch eine entsprechende zusätzliche Bande im Vergleich zum Proteinbandenmuster der uninduzierten Kultur (0) bzw. des *E. coli* Wildtyps zeigten (Abb. 3.39), konnten die Zellen anschließend zur Reinigung der rekombinanten Proteine mittels IMAC unter Verwendung des *Profinia*<sup>TM</sup>-Systems von *BioRad* (Kap. 2.2.4.5) herangezogen werden.

#### 3.3.4.1 Proteinreinigung der TRAP-A-Domäne und des Saglin aus *E. coli*

Zur Reinigung der rekombinanten Proteine aus *E. coli* wurde zunächst jeweils ein entsprechend großes Volumen LB-Medium (600 ml) inokuliert und bis zu einer  $OD_{600}$  von 0.5 bis 0.8 bei 37 °C kultiviert. Nach der Induktion mit 1 mM IPTG erfolgte die Proteinexpression über Nacht bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden schließlich geerntet und wie unter 2.2.4.4 beschrieben lysiert, wobei dem Ansatz zur Verbesserung der Löslichkeit der Proteine das Detergens CHAPS hinzugefügt wurde. Zur Entfernung unlöslicher Bestandteile wurde das Lysat anschließend zunächst zentrifugiert und nachfolgend über einen Partikelfilter (Durchmesser 0.45  $\mu$ m) filtriert. Um auch hier auf die Anwesenheit von unlöslichen Einschlusskörperchen zu testen wurden wiederum sowohl das Lysat (L) als auch das nach Zentrifugation erhaltene Pellet (P) elektrophoretisch analysiert (Abb. 3.39).

Die Reinigung der Proteine erfolgte schließlich unter Verwendung des *Profinia*<sup>TM</sup> Protein Purification Systems von BioRad (Kap. 2.2.4.5) entsprechend der Angaben des Herstellers, wobei die erhaltene Proteinlösung zugleich entsalzt wurde. Die einzelnen Fraktionen der Reinigung (Durchfluss (FT), Waschschrift 1 (W1), Waschschrift 2 (W2) und Eluat (E)) wurden aliquotiert und für spätere Analysen zurückgestellt. Die Proteinkonzentration im Eluat wurde wie gewohnt abermals von dem im System enthaltenen Detektor bestimmt und das Ergebnis gegebenenfalls mittels BCA-Assay überprüft (Kap. 2.2.4.6). Anschließend wurde der Erfolg der Proteinreinigung durch Analyse des Eluates mittels Bis-Tris-PAGE (Kap. 2.2.4.8) mit darauffolgender Coomassie-Färbung (Kap. 2.2.4.9) bzw. Immunodetektion unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gerichtet gegen den Hexa-Histidin-Rest (Kap. 2.2.4.11) sichtbar gemacht (Abb. 3.40).



**Abbildung 3.40. Elektrophoretische Analyse der Eluatfraktionen der A-Domäne und des Saglin aus *E. coli*.** A) Es wurden je 25  $\mu$ l (a) bzw. 5  $\mu$ l (b) Probe auf ein 12 %-iges Bis-Tris-PA-Gel aufgetragen, reduzierende Bedingungen (10 mM DTT); anschließend wurde das Gel mit kolloider Coomassie-Lösung gefärbt (a) bzw. das gereinigte rekombinante Protein mit einem gegen den Hexa-Histidin-Rest gerichteten Antikörper detektiert (b). B) SDS-PA-Gel der Fraktionen der Affinitätsreinigung von TRX:Saglin\_syn; nicht-reduzierende Bedingungen, nach Coomassie-Färbung.  $M_R$ : Angabe der relativen Molekülmasse  $\times 10^3$ . M: Proteinmarker. Rekombinantes Protein bzw. seine Multimere sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Weitere Erklärungen im Text.

Abbildung 3.40 zeigt, dass mit allen verwendeten Konstrukten das entsprechende rekombinante Protein erhalten werden konnte. Allerdings bereitete dabei auch hier, insbesondere die in *E. coli* BL21-Zellen akkumulierte A-Domäne betreffend, neben einer eher geringen Proteinakkumulationsrate der Umstand Probleme, dass eine erhebliche Menge des



rekombinanten Proteins bei der Aufarbeitung der Zellen als unlöslicher Bestandteil des Pellets abgetrennt und verworfen werden musste (Abb. 3.39). Eine denaturierende Reinigung der rekombinanten Proteine wurde aufgrund der Notwendigkeit der Rückfaltung zur nativen Konformation nicht vorgenommen, sondern versucht, die geringe Ausbeute an löslichem Protein durch ein größeres Kulturvolumen auszugleichen. Weiterhin fällt auf, dass die Eluatfraktionen der rekombinanten Proteine neben der monomeren Form des Proteins auch eine - z. T. trotz reduzierender Bedingungen - nicht unerhebliche Menge an Dimeren und Multimeren sowie fragmentiertes Protein enthalten. Insbesondere das Saglin-Thioredoxininfusionsprotein zeigte die Bildung eines Multimers (Abb. 3.39, Abb. 3.40). Die Bildung von Oligomeren unter reduzierenden Bedingungen ist wahrscheinlich das Ergebnis einer unvollständigen Reduktion der Proteine. Um eine Fragmentierung der gereinigten Proteine zu vermindern, wurde wiederholtes Auftauen und Einfrieren der gereinigten Proteinlösungen vermieden.

Die Ausbeute von etwa 3 bis 8 mg rekombinantem Protein pro 600 ml Bakterienkultur wurde als zufriedenstellend betrachtet. Allerdings konnte die entsalzte Proteinlösung nach der Affinitätsreinigung noch Verunreinigungen enthalten, die durch eine zweite Säulenpassage gegebenenfalls eliminiert hätten werden können. Auf diesen Schritt wurde aber unter dem Aspekt der Verringerung der Ausbeute verzichtet. Die gereinigten rekombinanten Proteine standen schließlich für die weiteren Applikationen zur Verfügung.

### 3.4 Heterologe Expression und Analyse von *Plasmodium falciparum* P25 und P28

P25 und P28 dominieren die Plasmamembran von Ookineten und sind innerhalb der Gattung *Plasmodium* hochkonserviert (Kap. 1.4.3). Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Bindung des Mitteldarmepithels (Siden-Kiamos & Louis, 2004; Siden-Kiamos *et al.*, 2000) und Gen-*Knockout*-Experimente ergaben, dass diese Proteine für den Parasiten essentiell sind, um im Mitteldarm von *Anopheles* zu überleben, das Mitteldarmepithel zu penetrieren und zu Oocysten zu reifen. Wenn beide Proteine fehlten wurde die Invasion von Ookineten in die Epithelzellen des Mitteldarms deutlich reduziert (Baton & Ranford-Cartwright, 2005) und die Entwicklung von *Plasmodium* unterbrochen (Tomas *et al.*, 2001). P25 und P28 sind gleichmäßig über die gesamte Oberfläche der Ookineten verteilt (Duffy *et al.*, 1993; Sinden *et al.*, 1987; Winger *et al.*, 1988) und die Ziele transmissionsblockierender Antikörper, die die Entwicklung von Oocysten im Darm der Stechmücke verhindern. Die beiden Proteine zeichnen sich durch mehrere Cystein-Reste und eine komplexe Tertiärstruktur aus, wodurch die Produktion in heterologen Expressionssystemen erschwert wird. Dennoch konnten mit verschiedenen P25- und P28-Varianten bereits einige Erfolge verzeichnet werden (vergleiche Kap. 1.4.3).

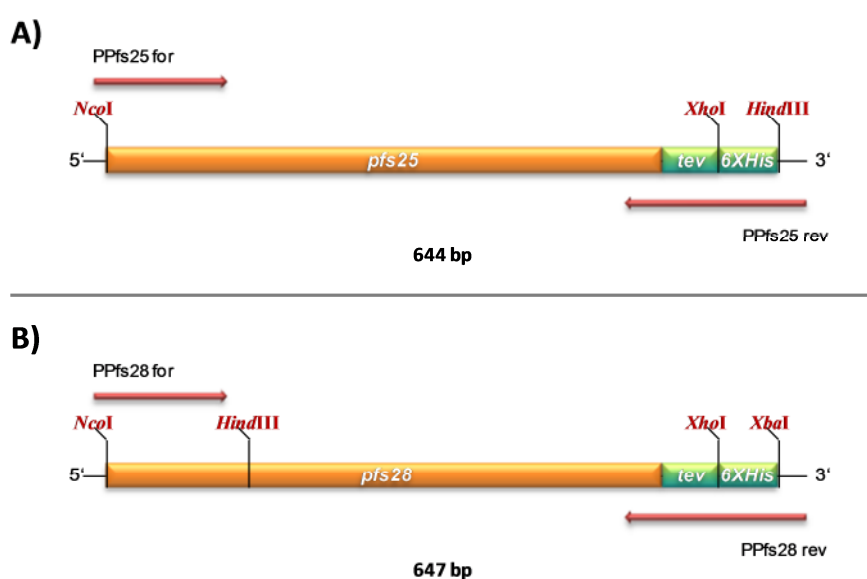
Als wichtige Zielstrukturen, die eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des Parasiten und daher der Transmission von *Plasmodium* spielen, sollten P25 und P28 analog zur TRAP-A-Domäne als plasmodiale Antigene sowohl im bakteriellen Expressionssystem als auch transient in *Nicotiana benthamiana* mit dem von der Firma *ICON Genetics* (Halle/Saale) entwickelten viralen System produziert werden. Neben der Beurteilung der Expressionssysteme sollte dies insbesondere wiederum die Grundlage für weitere Arbeiten schaffen und die Verwendung der rekombinanten Proteine zur Identifikation von Bindermolekülen unter Verwendung einer Phagenbibliothek ermöglichen. Die Produktion dieser Antikörperfragmente in einem für *Anopheles* geeigneten Applikationssystem könnte einen Beitrag zur Senkung der Transmission der Malaria leisten.

Da außerdem angenommen wird, dass P25 und P28 eine wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen Wirt und Parasit spielen (Appella *et al.*, 1988) und für beide Proteine gezeigt werden konnte, dass sie mit dem Laminin des Mitteldarms von *Anopheles* interagieren und diese Bindung an der Transformation zu Oocysten beteiligt ist (Arrighi & Hurd, 2002; Vlachou *et al.*, 2001), sollten darüber hinaus die beiden Proteine selbst in Fütterungsexperimenten mit *Anopheles* auf ihr inhibitorisches Potential hin untersucht werden. Als sogenannte kompetitive Antagonisten könnten sie die beteiligten Strukturen besetzen und so mit der Entwicklung von *Plasmodium* interagieren.

#### 3.4.1 Klonierung der *Plasmodium falciparum* *pfs25*- und *pfs28*-Varianten

Die Amplifikation der um das Signalpeptid (erste 22 Aminosäuren) verkürzten Sequenzen von *pfs25* (NCBI Reference Sequence: NC\_004314.2, GeneID: 810460) und *pfs28* (GeneID: 810459) erfolgte mittels PCR unter Verwendung der Primer *PPfs25 for* und *-rev* bzw. *PPfs28 for* und *-rev*

(Tab. 2.6). Die Primer wurden dabei derart gestaltet, dass am 5'-Ende der kodierenden Sequenz eine *Nco*I-Restriktionsschnittstelle sowie am 3'-Ende ein Hexa-Histidin-Rest und die Erkennungssequenzen für *Xho*I und *Hind*III (*Pfs*25) bzw. *Xba*I (*Pfs*28) eingefügt wurden (Abb. 3.41). Diese Modifikationen sollten in der Folge die Ligation in die verschiedenen Expressionsvektoren und damit sowohl die bakterielle als auch die pflanzliche Expression ermöglichen. Die Einführung einer Erkennungssequenz der TEV-Protease erlaubt die Abspaltung des Hexa-Histidin-Rests im Anschluss an die Affinitätsreinigung. Als Template für die Generierung von *pfs*25 und *pfs*28 wurde genomische DNA von *Plasmodium falciparum* NF54 verwendet (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Kai Matuschewski, Berlin).



**Abbildung 3.41. Schematische Darstellung der *pfs*25- (A) und *pfs*28-Variante (B).** Die Modifikationen der kodierenden Sequenz ermöglichen sowohl die bakterielle als auch die pflanzliche Expression unter Verwendung der Expressionsvektoren pET-32a(+), pET-28a(+) und pICH11599.

Das PCR-Produkt wurde anschließend zunächst in den Klonierungsvektor pCR2.1 ligiert und nach der Transformation kompetenter *E. coli* TOP10 und der Isolierung des Plasmids zur Verifizierung der Nukleotidsequenz sequenziert. Die Überprüfung der Nukleotidsequenz ergab für *Pfs*25 einen Aminosäureaustausch an Position 6 von Asparaginsäure (D) zu Glutaminsäure (E). Wegen der sehr ähnlichen Eigenschaften der beiden Aminosäuren wurde diese Mutation als konservativ und damit durch den Genotyp bedingt erachtet und beide Konstrukte für die Klonierung in die Expressionsvektoren weiterverwendet.

Nach einem entsprechenden Restriktionsverdau wurde *Pfs*25 als *Nco*I/*Hind*III-Fragment in die bakteriellen Expressionsvektoren pET-32a(+) und pET-28a(+) ligiert. Daraus resultierten die Plasmide pPfs25-2712 und pPfs25-2512, die zur Transformation von *E. coli* Origami(DE3) bzw. *E. coli* BL21(DE3) eingesetzt wurden (Tab. 3.8).

Tabelle 3.8: Übersicht der Konstrukte und Vektoren unter Angabe der hier verwendeten Nomenklatur sowie der zu erwartenden relativen Molekülmasse.

Konstrukt	Vektor	Nomenklatur	Relative Molekülmasse ( $M_R$ )
<b>Pfs25</b>	pET-32a(+)	pPfs25-2712	$\sim 41 \times 10^3$
	pET-28a(+)	pPfs25-2512	$\sim 24 \times 10^3$
<b>Pfs28</b>	pET-32a(+)	pPfs28-2712	$\sim 41 \times 10^3$
	pET-28a(+)	pPfs28-2512	$\sim 24 \times 10^3$

Die Verwendung von pET-32a(+) ermöglichte wiederum die Expression von Pfs25 als Fusion mit Thioredoxin zur Begünstigung der Ausbildung der korrekten Faltung im bakteriellen Cytoplasma. Die Klonierung von Pfs28 erfolgte analog zu Pfs25 als *NcoI/XhoI*-Fragment, wobei die Plasmide pPfs28-2712 und pPfs28-2512 erhalten wurden, die ihrerseits zur Transformation von *E. coli* Origami(DE3) bzw. *E. coli* BL21(DE3) und bakteriellen Proteinexpression verwendet wurden. Hier ermöglichte die Ligation als *NcoI/XhoI*-Fragment in die Vektoren pET-32a(+) und pET-28a(+) die C-terminale Fusion der kodierenden Sequenz mit einem Hexa-Histidin-Rest zur nachfolgenden Affinitätsreinigung.

Die Möglichkeit einer pflanzlichen Expression der hier klonierten Konstrukte unter Verwendung des transienten Virus-Vektor-basierten Systems von *ICON-Genetics* ist durch die Anwesenheit der entsprechenden Restriktionsschnittstellen zwar gegeben, konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht berücksichtigt werden.

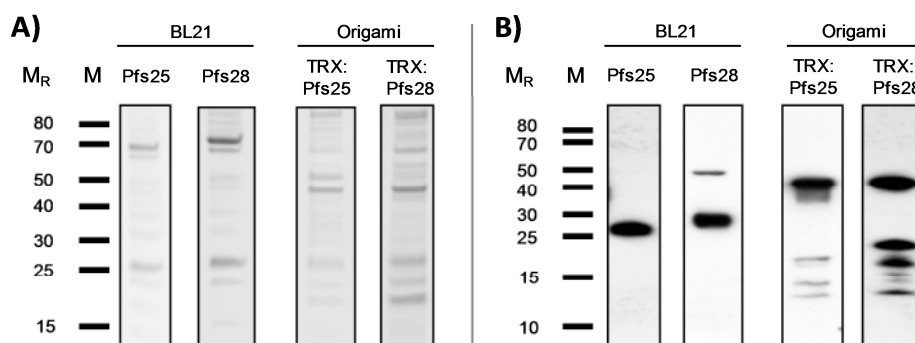
### 3.4.2 Bakterielle Expression von Pfs25 und Pfs28

Für die bakterielle Proteinexpression der beiden Proteine waren die entsprechenden kodierenden Sequenzen zuvor jeweils in die bakteriellen Expressionsvektoren pET-32a(+) und pET-28a(+) kloniert worden, so dass die Expression sowohl als Thioredoxin-Fusion als auch ohne den Fusionspartner erfolgen konnte. Nach der Transformation von *E. coli* Origami(DE3) (pET-32a(+)) und BL21(DE3) (pET-28a(+)) wurden die Zellen wie in Kap. 2.2.2.8 erläutert kultiviert, nach Erreichen einer  $OD_{600}$  von 0.5 bis 0.8 zur Induktion der Proteinexpression mit 1 mM IPTG versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur weiter inkubiert.

Zur Überprüfung der Proteinakkumulation wurden kleine Teilmengen der Kulturen unmittelbar vor der IPTG-Zugabe sowie nach erfolgter Induktion entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert (Daten nicht gezeigt). Die induzierten Zellen zeigten im Coomassie-gefärbten Gel keine eindeutige zusätzliche Bande im Vergleich zum Proteinbandenmuster der uninduzierten Kultur bzw. des *E. coli* Wildtyps, sondern rekombinantes Protein konnte lediglich mittels Immunoblot detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dennoch wurden die Zellen anschließend geerntet, lysiert (Kap. 2.2.4.4) und die rekombinanten Proteine mittels IMAC gereinigt (Kap. 2.2.4.5).

### 3.4.2.1 Proteinreinigung von Pfs25 und Pfs28 aus *E. coli*

Für eine für nachfolgende Anwendungen entsprechende Ausbeute an rekombinantem Protein wurden zur Reinigung mindestens 600 ml Kultur inokuliert und wie zuvor beschrieben aufgearbeitet. Dem Ansatz wurde zur Verbesserung der Löslichkeit der Proteine das Detergens CHAPS zugesetzt. Nach der Zentrifugation und Filtration des erhaltenen Lysats erfolgte die Reinigung der rekombinanten Proteine mittels IMAC unter Verwendung des *Profinia™ Protein Purification Systems* der Firma *BioRad* (Kap. 2.2.4.5). Dabei wurde die gewonnene Proteinlösung entsalzt sowie die einzelnen Fraktionen der Reinigung aliquotiert und bei -20°C zurückgestellt. Der ermittelte Proteingehalt der Eluatfraktion wurde gegebenenfalls mittels BCA-Assay (Kap. 2.2.4.6) überprüft. Im Anschluss an die Reinigung erfolgte deren Analyse, wobei die gereinigten Proteine mittels PAGE (Kap. 2.2.4.8) mit anschließender Coomassie-Färbung bzw. Immunodetektion unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gerichtet gegen den Hexa-Histidin-Rest sichtbar gemacht wurden (Kap. 2.2.4.11; Abb. 3.42).



**Abbildung 3.42. Detektion der gereinigten bakteriell exprimierten Proteine mittels PAGElektrophorese (A) bzw. Immunoblot (B).** Es wurden je 30 µl (A) bzw. 5 bis 20 µl (B) der Eluatfraktion auf ein Bis-Tris-Polyacrylamidgel aufgetragen; das Gel wurde schließlich mit kolloidalen Coomassie-Lösung gefärbt (A) bzw. die Proteine mit einem Antikörper gerichtet gegen den Hexa-Histidin-Rest detektiert (B). Exposition des Films: 3 bis 30 min. M<sub>R</sub>: Angabe der relativen Molekülmasse x 10<sup>3</sup>. M: Proteinmarker.

Wie Abbildung 3.42 verdeutlicht, konnten Pfs25 und Pfs28 zwar rekombinant in *E. coli* produziert und aufgereinigt werden, jedoch wiesen die Eluatfraktionen einen relativ hohen Anteil an Verunreinigungen durch bakterielle Proteine sowie fragmentiertem rekombinantem Protein auf. Darüber hinaus zeichnete sich die bakterielle Expression der beiden Proteine durch eine sehr geringe Proteinakkumulationsrate aus, die im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht optimiert werden konnte. Aus 600 ml Bakterienkultur konnten daher lediglich zwischen 1 und 8 mg Protein gewonnen werden.

Da für die Fütterungsexperimente mit *Anopheles* die Reinheit der angebotenen Proteinlösungen eine eher untergeordnete Rolle spielt und gleichzeitig zur Generierung von Antikörperfragmenten eine sehr geringe Menge Protein ausreichend sein sollte, wurden die gereinigten Pfs25- und Pfs28-Varianten in der verfügbaren Form für die weiteren Anwendungen verwendet.

### 3.5 Expression der potentiell inhibitorischen Proteine im Phloem-Saft von *Ricinus communis* L. durch *A. tumefaciens* vermittelten Gentransfer

Neben der Etablierung und Analyse verschiedener Expressionssysteme zur Produktion der potentiell *Plasmodium*-inhibitorischen Proteine SM1, PcFK1 und PcFK2, wie dem transienten Virus-Vektor basierten System von *ICON-Genetics* und dem pET-System zur bakteriellen heterologen Expression, sollten die Proteine außerdem unter der Kontrolle eines Phloem-spezifischen Promotors stabil in *Ricinus communis* exprimiert werden. Dazu sollten die entsprechenden Konstrukte generiert (Tab. 3.9) und das Expressionssystem etabliert werden. Über den Phloem-Saft sollten die Targetproteine in den Nektar der Pflanze gelangen und *Anopheles*-Moskitos in Fütterungsexperimenten verabreicht werden.

Tabelle 3.9: Zu testende Konstrukte für die stabile Expression in *Ricinus communis* L. Die Expression der Proteine sollte unter der Kontrolle des *AtSUC2*-Promotors erfolgen.

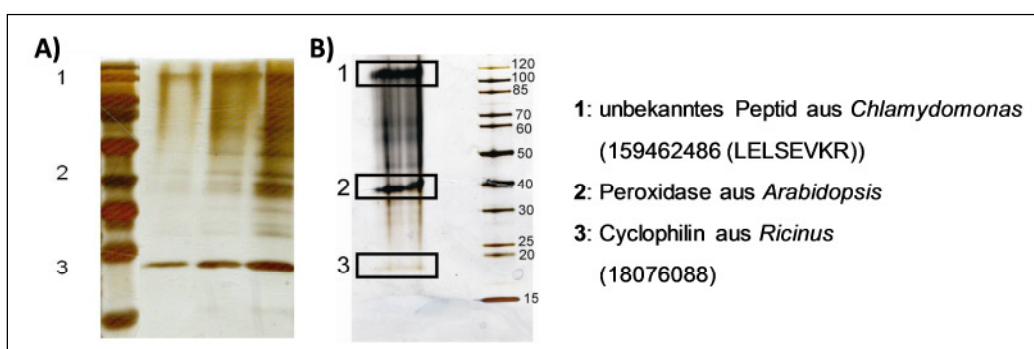
Konstrukt	Vektor	Nomenklatur
<b>GFP</b>	pPSI	pAtSUC2-7100
<b>GFP:PcFK1</b>	pPSI	pAtSUC2-GFP:PcFK1-7111
<b>GFP:PcFK2</b>	pPSI	pAtSUC2-GFP:PcFK2-7111
<b>GFP:MCoTI-II</b>	pPSI	pAtSUC2-GFP:MCoTI-II-WT-7111
<b>GFP:MCoTI-II-SM1</b>	pPSI	pAtSUC2-GFP:MCoTI-II-SM1-7111

Grundsatz hierfür ist die Tatsache, dass in höheren Pflanzen der Transport von Photoassimilaten, Pflanzenhormonen und einer Vielzahl weiterer Signalmoleküle im Phloem stattfindet. Dazu gehören neben kleineren Molekülen also auch Aminosäuren und sogar Makromoleküle wie Proteine und RNA (Balachandran *et al.*, 1997; Sjolund, 1997), wobei angenommen wird, dass die entsprechenden Proteine in den Geleitzellen synthetisiert werden und durch die Plasmodesmata in die Siebelemente gelangen (Kap. 1.5.2). Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob die inhibitorischen Kandidatenproteine SM1, PcFK1 und PcFK2 durch die Expression im Phloem von *Ricinus communis* im Nektar der Pflanze nachweisbar wären und auf diesem Wege dem Malaria-Vektor angeboten werden könnten.

*Ricinus communis* erscheint in dieser Hinsicht aus mehreren Gründen als geeignetes Expressionssystem: Er besitzt nicht nur eine Vielzahl extra-floraler Nektarien an den Petiolen seiner Blätter, sondern es konnte auch *A. gambiae* bei der Nahrungsaufnahme an *Ricinus* beobachtet werden, der wegen seiner ölhaltigen Samen eine bedeutende Nutzpflanze und zudem vor allem in tropischen und subtropischen Ländern weit verbreitet ist (Kap. 1.5.2; Abb. 1.12).

Einen ersten Hinweis darauf, dass die Möglichkeit besteht, Phloem-spezifische Proteine im Nektar wiederzufinden, gibt das Protein Cyclophilin aus *R. communis*. Es konnte gezeigt werden,

dass Cyclophilin im Phloemsaft des *Ricinus* vorhanden ist (Barnes *et al.*, 2004; Gottschalk *et al.*, 2008). Durch eine Untersuchung des Nektars konnte darüber hinaus im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich dieses Protein ebenso im Nektar findet. Dazu wurde eine Probe des Nektars mittels SDS-PAGE mit anschließender MS-Untersuchung der prominentesten Banden analysiert (freundlicherweise von Yvonne Reinders, Universität Regensburg, durchgeführt; Abb. 3.43). Dies impliziert, dass Phloem-spezifische Proteine in den Nektar weitergeleitet werden können und eine Expression der inhibitorischen Kandidatenproteine im Nektar prinzipiell möglich ist.



**Abbildung 3.43. Analyse der Zusammensetzung des Nektars von *Ricinus communis*.** A) SDS-PAGE einer Nektarprobe. Von links nach rechts: Marker; 5 -; 10 -; 20 µl Probe. Das Gel wurde nach der Elektrophorese einer Silberfärbung unterzogen. B) Gel der elektrophoretischen und massenspektrometrischen Untersuchung der Nektarprobe (Y. Reinders, Regensburg) mit der entsprechenden Zuordnung der prominentesten Banden 1, 2 und 3.

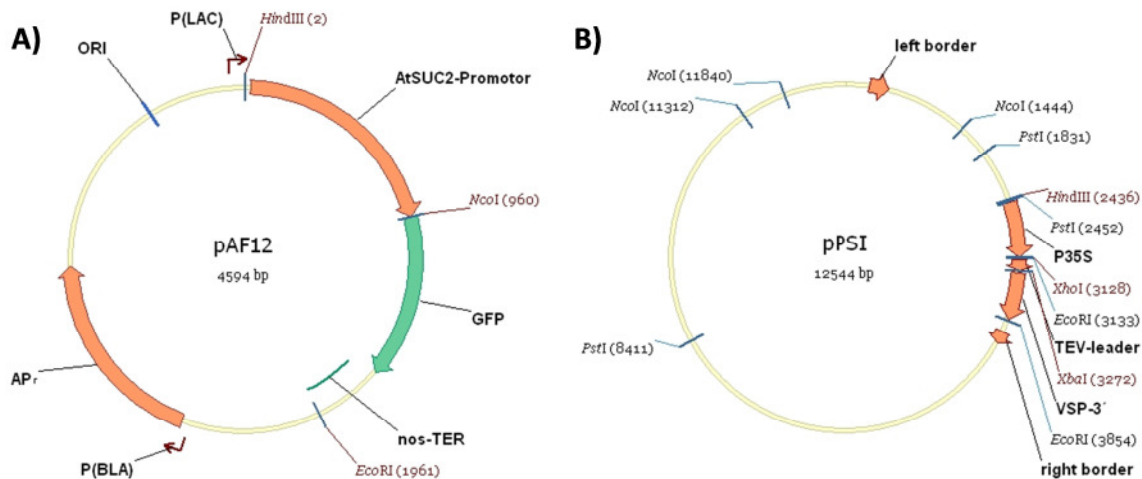
Das zu etablierende Expressionssystem sollte nach erfolgreicher Transformation von *Ricinus communis* hinsichtlich der Proteinakkumulation und der Lokation der rekombinanten Proteine (Phloem/Nektar) beurteilt sowie zu Fütterungsexperimenten mit *Anopheles* herangezogen werden.

Die Expression der Proteine in Produktionssystemen, die eine schnellere Verfügbarkeit der rekombinanten Proteine in Fütterungsexperimenten mit *Anopheles* ermöglichen, wurde aufgrund der langwierigen Regeneration von *R. communis* zeitgleich durchgeführt und für erste Ergebnisse bezüglich des inhibitorischen Potentials auch als primäres Ziel verfolgt.

### 3.5.1 Klonierung der Varianten zur stabilen Expression in *Ricinus communis* L.

Da die stabile Expression in *R. communis* unter der Kontrolle des *AtSUC2*-Promotors erfolgen sollte (vergleiche Kap. 1.5.2), mussten die entsprechenden kodierenden Bereiche aus den schon vorhandenen Konstrukten isoliert und jeweils hinter die Promotorsequenz kloniert werden. Der *AtSUC2*-Promotor wurde freundlicherweise in Form des Plasmids pAF12 (Abb. 3.44 A) von Norbert Sauer, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, zur Verfügung gestellt. Dieses enthält eine für GFP kodierende Sequenz, die der Kontrolle des *AtSUC2*-Promotors unterliegt. So konnte einerseits die Sequenz des Promotors allein als *HindIII/NcoI*-Fragment, andererseits mit

der darauffolgenden *gfp*-Sequenz als *HindIII*/*EcoRI*-Fragment für die folgenden Anwendungen verwendet werden.



**Abbildung 3.44. Schematische Darstellung der Plasmide pAF12 (A) und pPSI (B).** A) Das Plasmid pAF12 enthält eine für *gfp* kodierende Sequenz, die der Kontrolle des *AtSUC2*-Promotors unterliegt. Zur Selektion enthält der Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen. B) Im Pflanzenexpressionsvektor pPSI erfolgt die Expression unter der Kontrolle des 35S Promotors (P35S) des Blumenkohl-Mosaikvirus (*cauliflower mosaic virus*, CaMV). Zur Selektion enthält der Vektor das Gen für eine Neomycin-Phosphotransferase, *nptII*, das Resistenz gegenüber bestimmten Aminoglycosid-Antibiotika wie Kanamycin, Hygromycin oder Paromomycin vermittelt.

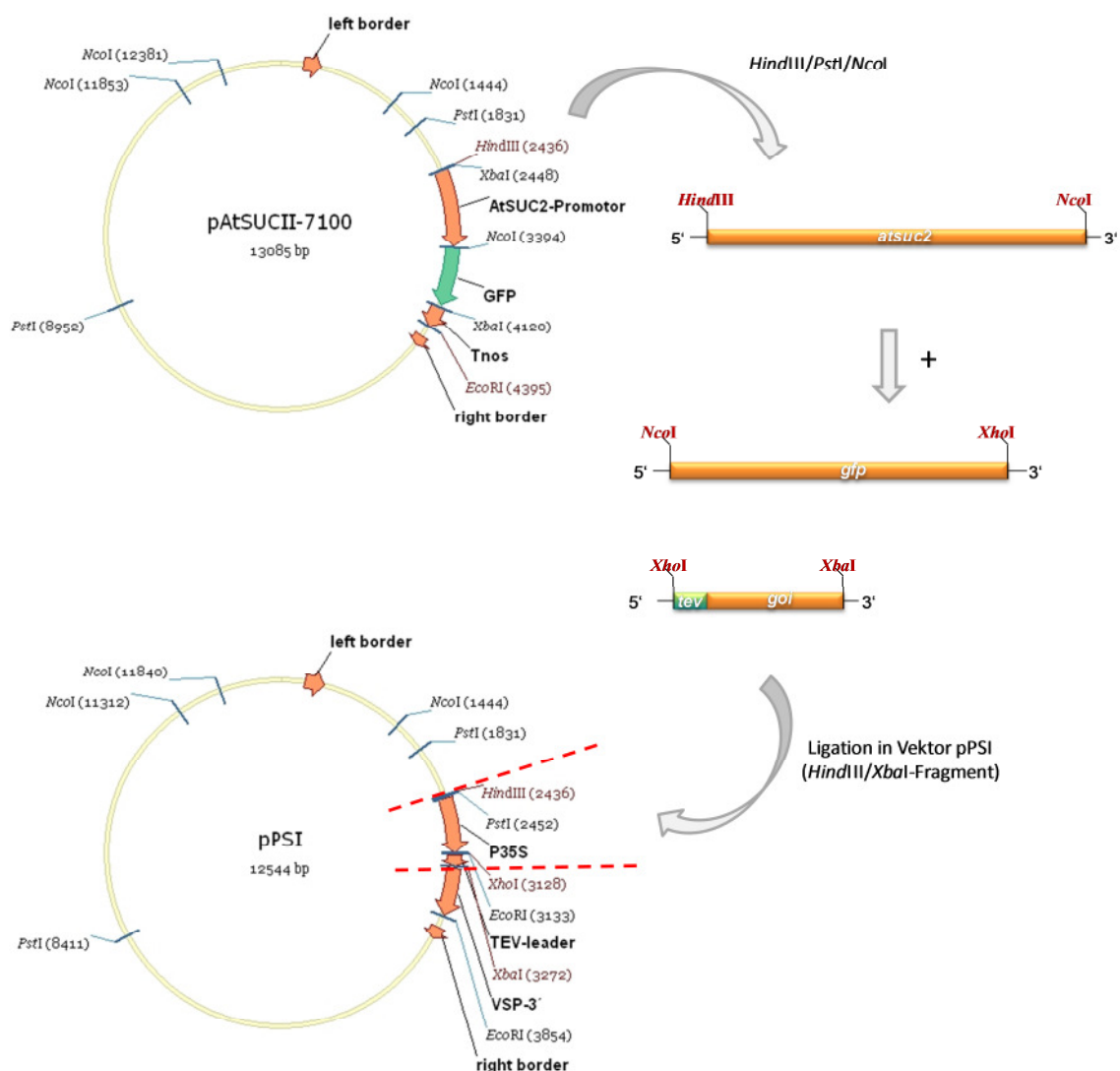
Für die stabile Expression in *R. communis* sollten unter Verwendung des Pflanzenexpressionsvektors pPSI (Abb. 3.44 B) die in Tabelle 3.9 aufgeführten Konstrukte generiert werden. Dazu wurde aus dem Plasmid pAF12 nach der Transformation kompetenter *E. coli* TOP10 mit anschließender Plasmidpräparation das etwa 1960 bp große *HindIII*/*EcoRI*-Fragment isoliert und in den mit *HindIII* und *EcoRI* linearisierten Expressionsvektor pPSI ligiert. Daraus resultierte das Plasmid pAtSUC2-7100 (Abb. 3.45), das anschließend zur Transformation von *A. tumefaciens* GV3101 verwendet wurde. Der Transformationserfolg wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer *PGFP 108* und *PGFP 211* (Tab. 2.6) verifiziert. Positive Klone wurden in Rifampicin-, Gentamicin- und Kanamycin-haltigem LB-Medium kultiviert und schließlich zur Transformation von *Ricinus communis* verwendet (Kap. 2.2.3.4.2).

Die Erzeugung der übrigen Konstrukte erfolgte wie in Abbildung 3.45 verdeutlicht. Da die potentiell inhibitorischen Proteine als Fusion mit GFP exprimiert werden sollten, musste zur Verwirklichung der Klonierungsstrategie eine *gfp*-Variante verwendet werden, die über eine N-terminale *NcoI*- sowie eine C-terminale *XhoI*-Restriktionsschnittstelle verfügt. Dabei diente zur Generierung dieser *gfp*-Variante der *ICON*-Vektor pICH7410 (Kap. 2.1.8) als Vorlage in einer PCR mit den Primern *PGFP 108* und *PGFP 211* (Tab. 2.6), durch die die entsprechenden Modifikationen eingeführt wurden. Nach der Amplifikation und Gelextraktion erfolgte die Ligation des etwa 750 bp großen PCR-Produkts in den Klonierungsvektor pCR2.1 sowie die



Transformation kompetenter *E. coli* TOP10. Schließlich wurde das resultierende Plasmid pGFP<sub>b</sub>-1311 isoliert, mittels Restriktionsverdau mit *Nco*I und *Xho*I auf das Insert getestet und sequenziert. Das Plasmid pGFP<sub>b</sub>-1311 konnte anschließend neben den übrigen zuvor bereits generierten Konstrukten (Kap. 3.1.1 und Kap. 3.2.1) für die Erzeugung der Plasmide zur stabilen Expression in *R. communis* verwendet werden (Abb. 3.45).

Dafür wurde das Plasmid pAtSUC2-7100 einem Restriktionsverdau mit *Hind*III, *Pst*I und *Nco*I unterzogen, um daraus die Promotorregion (*atsuc2*) zu erhalten. Der Zusatz von *Pst*I war hier nötig, da sonst durch die Entstehung gleich großer Fragmente eine Isolierung des *Hind*III/*Nco*I-Fragmentes aus dem Agarose-Gel nicht möglich gewesen wäre.



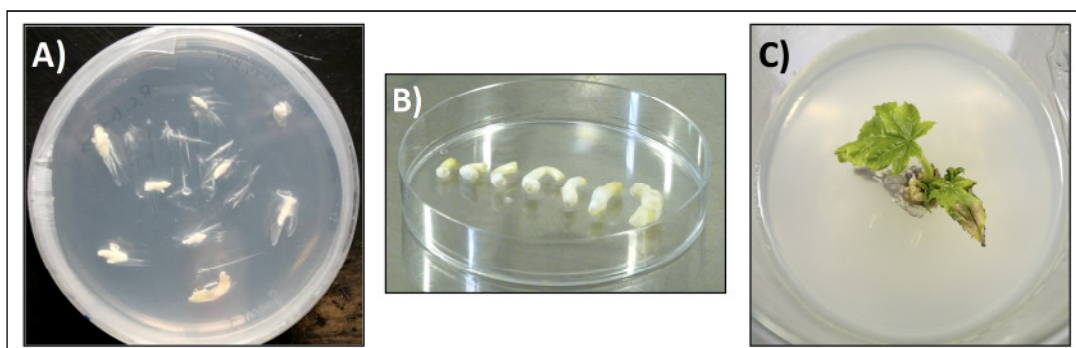
**Abbildung 3.45. Schematische Darstellung der Ligation zur Erstellung der Konstrukte für die stabile Transformation von *Ricinus*.** Nach der Isolation von *atsuc2* als *Hind*III/*Nco*I-Fragment aus pAtSUC2-7100 erfolgte die Ligation zusammen mit *gfp* als *Nco*I/*Xho*I-Fragment und jeweils dem *Xho*I/*Xba*I-Fragment der inhibitorischen Peptide (*gpi*) in den mit *Hind*III und *Xba*I linearisierten Expressionsvektor pPSI. *gpi*: gene of interest.

Gleichzeitig erfolgte eine *NcoI/XhoI*-Restriktion mit Plasmid pGFP<sub>b</sub>-1311 zur Isolierung der *gfp*-Sequenz. Die Promotorregion wurde anschließend in einer Ligationsreaktion zusammen mit *gfp* und jeweils dem *XhoI/XbaI*-Fragment von *pcfk1*, *pcfk2*, *mcoti-II* oder *mcoti-II-sm1* in den mit *HindIII* und *XbaI* linearisierten Pflanzenexpressionsvektor pPSI eingebracht (Abb. 3.45).

Obwohl zwar alle o. g. Konstrukte generiert wurden, wurde zur Etablierung des Expressionssystems und für erste Untersuchungen bezüglich Proteinexpression und –akkumulation zunächst primär Plasmid pAtSUC2-7100 für die Transformation von *R. communis* verwendet. Mit diesem Konstrukt sollte die Expression von GFP unter der Kontrolle des *AtSUC2*-Promotors getestet und eine erste Aussage über Akkumulation und Lokalisation ermöglicht werden.

### 3.5.2 Regeneration und stabile Transformation von *Ricinus communis* L. mittels *Agrobacterium* unter Verwendung der Embryonen reifer Samen

Nachdem die Transformation von *Ricinus communis* L. nach dem Protokoll von US-Patent 6620986 (McKeon & Chen, 2003) unter Verwendung der Blütenknospen keine positiven Resultate lieferte (Daten nicht gezeigt), erfolgte die Transformation mit Modifikationen in Anlehnung an das Protokoll der meristem-basierten Transformationsmethode von Sujatha und Sailaja (Sujatha & Sailaja, 2005; Kap. 2.2.3.4.2). Dabei wurden die Embryonen reifer Samen isoliert, wenige Tage vorkultiviert und anschließend für die Transformation mit *A. tumefaciens* verwendet, wobei pro Transformationsereignis verschiedene Verdünnungen der Bakteriensuspension verwendet wurden. Nach einer etwa einwöchigen Kokultivierungsphase und anschließender Kultivierung auf Cefotaxim-haltigem Medium zur Entfernung der Agrobakterien erfolgte die Selektion mit ansteigenden Konzentrationen Hygromycin (Kap. 2.2.3.4.2). Gleichzeitig wurden als Kontrolle des Regenerationsprotokolls und zur Generierung von Wildtyp-Pflanzen uninfizierte Embryonen unter den gleichen Bedingungen kultiviert, wobei auf die Zugabe von Hygromycin ins Medium verzichtet wurde. Abbildung 3.46 zeigt die einzelnen Stufen des Regenerations- bzw. Transformationsprotokolls.

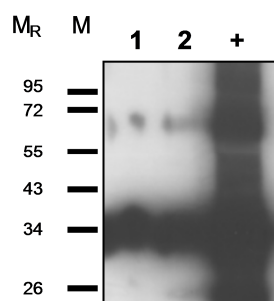


**Abbildung 3.46. Darstellung der einzelnen Phasen der Regeneration und Transformation von *Ricinus communis* L.** A) Frisch explantierte Embryonen auf MS-Medium. B) Gekeimte Explantate nach 7 Tagen Vorkultivierungszeit. Die meristematische Region ist an ihrer charakteristischen Schwellung zu erkennen. C) Transformierte *Ricinus*-Pflanze.

### 3.5.3 Expression der GFP-Variante unter der Kontrolle des *AtSUC2*-Promotors

Die Regeneration und Transformation von *Ricinus communis* unter Verwendung des beschriebenen Protokolls zeichnete sich durch eine niedrige Regenerationsrate, ein unkontrolliertes Wachstum der zur Transformation verwendeten Agrobakterien sowie das damit einhergehende verfrühte Absterben der putativen Transformanten aus. Eine Verringerung der Zelldichte der zur Transformation verwendeten Bakteriensuspension lieferte keine besseren Ergebnisse. Zudem war eine große Anzahl explantierter Embryonen nötig, da nach deren Vorkultivierung auf MS-Medium nur einige wenige als Zeichen der fortschreitenden Proliferation eine geschwollene meristematische Region aufwiesen und zur Transformation herangezogen werden konnten. So konnten nur durchschnittlich 10 % der explantierten Embryonen transformiert werden, wodurch die Transformationsrate schon zu Beginn durch die Anzahl an geeigneten Explantaten limitiert wurde.

Nach zahlreichen Transformationsereignissen konnten schließlich zwei transformante Pflanzen generiert werden, die GFP unter der Kontrolle des *AtSUC2*-Promotors exprimierten. Der Nachweis der GFP-Expression erfolgte mittels SDS-PAGE des Blattmaterials (Kap. 2.2.4.7) mit sich anschließender Immunodetektion unter Verwendung eines anti-GFP-Antikörpers (Kap. 2.2.4.11; Abb. 3.47). Eine weitere Analyse der erzeugten Transformanten, z. B. bezüglich Akkumulationsrate oder Lokalisation des Proteins, war jedoch aufgrund des baldigen Absterbens der Pflanzen unmöglich.



**Abbildung 3.47. Immunoblot des Blattmaterials der beiden generierten *Ricinus*-Transformanten.** Es wurde jeweils eine Blattprobe entnommen, zermörsert und in 200  $\mu$ l SDS-Probenpuffer aufgekocht. Vom Überstand wurden 25  $\mu$ l für die Elektrophorese verwendet. Die Detektion des GFP erfolgte mit einem spezifischen Antikörper.  $M_R$ : Angabe der relativen Molekülmasse  $\times 10^3$ . M: Proteinmarker. 1: Pflanze 1; 2: Pflanze 2; +: Positivkontrolle (GFP-exprimierendes *N. benthamiana*-Blattmaterial).

Wegen der äußerst aufwendigen Regeneration und Transformation von *Ricinus communis* konnten im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich der Expression der potentiell *Plasmodium*-inhibitorischen Proteine keine weiteren Ergebnisse erzielt werden.

### 3.6 Ergebnisse der inhibitorischen Untersuchungen mit *Anopheles stephensi*

Wie zuvor beschrieben wurden verschiedene potentielle Inhibitoren und kompetitive Antagonisten der Entwicklung von *Plasmodium* generiert, wobei die Expression im bakteriellen System und/oder in der Pflanze erfolgte. Diese sogenannten transmissionsblockierenden Proteine sollten entweder unmittelbar oder als plasmodiale Antigene als kompetitive Antagonisten an bestimmte Strukturen innerhalb des Moskitos, z. B. an das Mitteldarmepithel, binden und nun in Fütterungsexperimenten mit *Anopheles* hinsichtlich ihrer *Plasmodium*-inhibitorischen Wirksamkeit untersucht werden. Eine Übersicht der getesteten Proteine bzw. Konstrukte liefert Tabelle 3.10.

Tabelle 3.10: Übersicht der zu Fütterungsexperimenten mit *Anopheles* verwendeten Proteine. Angegeben sind die getesteten Varianten, das zur Produktion verwendete Expressionssystem sowie die in dieser Arbeit untersuchte Funktion.

Kandidatenproteine	Varianten	Expressionssystem	untersuchte Funktion
GFP	GFP	<i>N. benthamiana</i>	Negativ-Kontrolle
MCoTI-II	TRX:MCoTI-II	<i>E. coli</i> Origami(DE3)	Negativ-Kontrolle
	GFP:MCoTI-II	<i>N. benthamiana</i>	
MCoTI-II-SM1	TRX:MCoTI-II-SM1	<i>E. coli</i> Origami(DE3)	Inhibitor
	GFP:MCoTI-II-SM1	<i>N. benthamiana</i>	
AGRP-SM1	TRX:AGRP-SM1	<i>E. coli</i> Origami(DE3)	Inhibitor
[SM1] <sub>8</sub>	TRX:[SM1] <sub>8</sub>	<i>E. coli</i> Origami(DE3)	Inhibitor
PcFK1	GFP:PcFK1	<i>N. benthamiana</i>	Inhibitor
PcFK2	GFP:PcFK2	<i>N. benthamiana</i>	Inhibitor
Pfs25	Pfs25	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	komp. Inhibitor
Pfs28	Pfs28	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	komp. Inhibitor

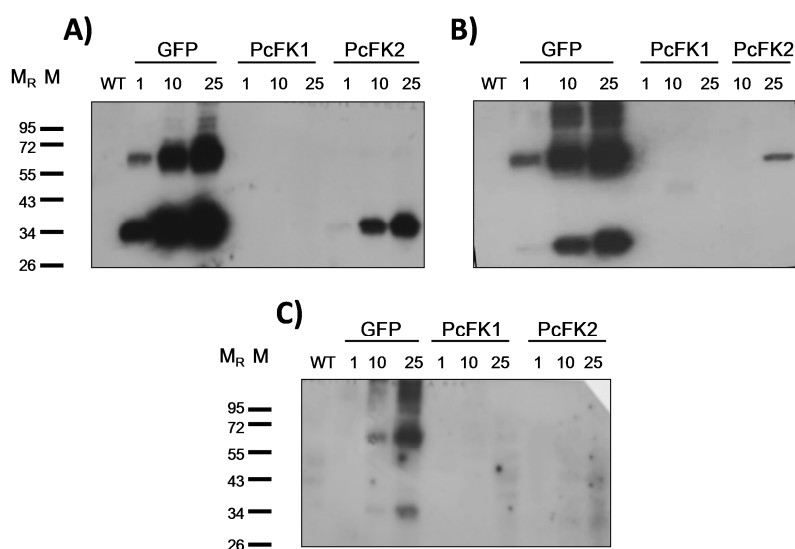
#### 3.6.1 Verweildauer und Nachweisbarkeit der Proteine im Mosquito

In einer ersten Untersuchung sollte zunächst mittels SDS-PAGE mit anschließendem Immunoblot geklärt werden, ob die Proteine verabreicht in Lösung zusammen mit der Zuckernährlösung von den Moskitos aufgenommen würden und wie lange sie in der Mücke nachweisbar und somit stabil wären.

Dazu wurden die in der Klimakammer des Instituts für Botanik gezüchteten *Anopheles stephensi* verwendet, wobei es sich hier allein um den Vektor handelte, da hier zu keinem Zeitpunkt eine Infektion mit *Plasmodium* erfolgte (Kap. 2.2.5.1). Vor Beginn der Fütterungsexperimente wurden

die Moskitos etwa 24 Stunden ausgehungert, um die Wahrscheinlichkeit der Aufnahme der angebotenen Proteinlösung zu erhöhen.

In einem ersten Experiment wurden die Moskitos mit *N. benthamiana*-Blattmaterial gefüttert. Dazu wurde jeweils 1 g Blattmaterial mit 5 ml 10 %-iger (w/v) Saccharoselösung gerührt, filtriert und auf einem Wattepad den Moskitos angeboten. Diese waren zuvor zu je etwa 50 Weibchen auf kleine Käfige verteilt worden. Je ein Käfig wurde schließlich mit dem Extrakt von *N. benthamiana*-WT, GFP-, GFP:PcFK1- und GFP:PcFK2-exprimierendem Blattmaterial gefüttert, wobei die Proteine rund 24 Stunden angeboten wurden. Die zu verfütternde Lösung war zudem durch den Zusatz von Lebensmittelfarbe grün eingefärbt, um die Aufnahme der Lösung durch ein grün gefärbtes Abdomen sichtbar zu machen. Nach 24 Stunden wurde das Wattepad entfernt und je Ansatz wurden 10 Weibchen entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren, zermörsert und mit 150  $\mu$ l 1 x SDS-Probenpuffer versetzt. Nach dem Aufkochen bei 95°C für 10 Minuten wurden je 1, 10 und 25  $\mu$ l des Überstandes auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Von dem Ansatz, der mit Blattmaterial des *N. benthamiana*-Wildtyps gefüttert worden war, wurden 25  $\mu$ l aufgetragen. Anschließend erfolgte die Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran und die Detektion mittels anti-GFP-Antikörper (Abb. 3.48, A). Nach weiteren 24 (Abb. 3.48, B) und 48 Stunden (Abb. 3.48, C) wurden wieder je 10 Weibchen entnommen und auf die gleiche Weise verfahren.

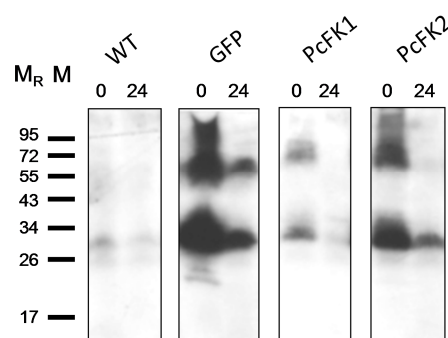


**Abbildung 3.48. Immunoblot der mit *N. benthamiana*-Blattmaterial gefütterten Moskitos.** Ein mit der Probelösung getränktes Wattepad wurde für 24 Stunden als Mahlzeit angeboten. Schließlich wurden je Ansatz und Entnahmezeitpunkt 10 Weibchen für die Analyse verwendet. A) Zeitpunkt 0 nach 24 h Fütterungszeit. B) 24 h nach Ende der Fütterung. C) 48 h nach Ende der Fütterung. WT: mit *N. benthamiana*-Wildtyp gefütterte Moskitos; GFP: mit *N. benthamiana*-Blattmaterial nach Koinfiltration des 3'-Moduls pICH7410 mit pICH15879 (Akkumulation von GFP im Cytosol) gefütterte Moskitos; PcFK1: mit *N. benthamiana*-Blattmaterial nach Koinfiltration des 3'-Moduls pGFP:PcFK1-6121 mit pICH15879 (Akkumulation von GFP:PcFK1 im Cytosol) gefütterte Moskitos; PcFK2: mit *N. benthamiana*-Blattmaterial nach Koinfiltration des 3'-Moduls pGFP:PcFK2-6121 mit pICH15879 (Akkumulation von GFP:PcFK2 im Cytosol) gefütterte Moskitos; M: Proteinmarker;  $M_r$ : Angabe der relativen Molekülmasse  $\times 10^3$ . Weitere Erklärungen im Text.

So konnte gezeigt werden, dass nicht nur eine Aufnahme der Proteine mit der Zuckernährlösung erfolgte, sondern auch offensichtlich in Abhängigkeit von der mit dem Blattmaterial applizierten Proteinmenge 48 Stunden nach der Fütterung im Moskito noch Protein nachweisbar war (GFP). Für die GFP:PcFK1-Fusion war anscheinend der Proteingehalt im verwendeten Blattmaterial für einen Nachweis der Aufnahme zu gering. Eine mangelhafte Aufnahme des Proteins konnte durch die Färbung des Abdomens der Moskitos nach der Fütterung ausgeschlossen werden. GFP:PcFK2 war noch 24 Stunden nach Beendigung der Fütterung nachweisbar (Abb. 3.48, B). Darüber hinaus scheint es, als würde mit steigender Verweildauer innerhalb des Moskitos die Bildung von Dimeren begünstigt, da sowohl nach 24 Stunden (GFP und GFP:PcFK2, Abb. 3.48, B) als auch nach 48 Stunden (GFP, Abb. 3.48, C) ein verhältnismäßig höherer Anteil an Dimeren zu beobachten war als beim ersten Entnahmezeitpunkt (Abb. 3.48, A).

In einer weiteren Untersuchung wurde oben beschriebenes Experiment wiederholt, wobei diesmal die mittels IMAC gereinigten transient produzierten Proteine (GFP, GFP:PcFK1, GFP:PcFK2, alle cytosolisch exprimiert in *N. benthamiana*) verwendet wurden.

Wieder wurden Wattepad mit jeweils 5 ml der Proteinlösung getränkt und etwa 24 Stunden angeboten. Dabei betrug die Konzentration an rekombinantem Protein 0.1 mg pro ml 10 %-iger (w/v) Saccharoselösung, die abermals mit Lebensmittelfarbe grün gefärbt wurde. Als Negativkontrolle wurde 10 %-ige (w/v) Saccharoselösung verfüttert. Anschließend wurde wie zuvor beschrieben verfahren. Nach der Verfütterung der gereinigten transient exprimierten Proteine konnten diese bis etwa 24 Stunden nach Beendigung der Fütterung in der Mücke nachgewiesen werden (Abb. 3.49).



**Abbildung 3.49. Immunoblot der mit den gereinigten Proteinen gefütterten Moskitos.** Ein mit der Probelösung getränktes Wattepad wurde 24 Stunden als Mahlzeit angeboten. Schließlich wurden je Ansatz und Entnahmezeitpunkt 10 Weibchen für die Analyse verwendet. 0: Zeitpunkt 0 nach 24 h Fütterungszeit. 24: 24 h nach Ende der Fütterung. WT: mit 10 %-iger Saccharoselösung gefütterte Moskitos; GFP: mit gereinigtem GFP aus *N. benthamiana*-Blattmaterial nach Koinfiltration des 3'-Moduls pGFP-6121 mit pICH15879 (Akkumulation von GFP im Cytosol) gefütterte Moskitos; PcFK1: mit gereinigtem GFP:PcFK1 aus *N. benthamiana*-Blattmaterial nach Koinfiltration des 3'-Moduls pGFP:PcFK1-6121 mit pICH15879 (Akkumulation von GFP:PcFK1 im Cytosol) gefütterte Moskitos; PcFK2: mit gereinigtem GFP:PcFK2 aus *N. benthamiana*-Blattmaterial nach Koinfiltration des 3'-Moduls pGFP:PcFK2-6121 mit pICH15879 (Akkumulation von GFP:PcFK2 im Cytosol) gefütterte Moskitos; M: Proteinmarker; M<sub>R</sub>: Angabe der relativen Molekülmasse x 10<sup>3</sup>. Weitere Erklärungen im Text.

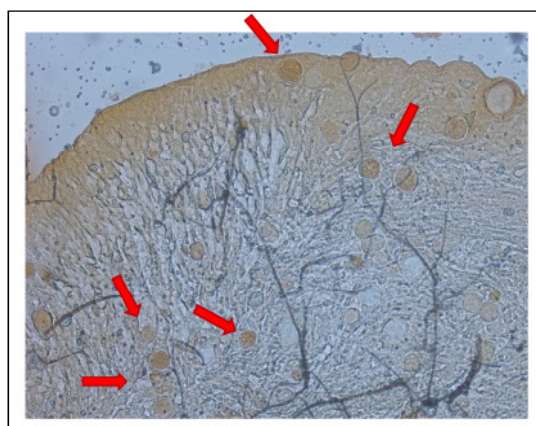
Die Ergebnisse der beiden Fütterungsexperimente implizieren, dass zwar die Applikation gereinigten Proteins die Vorteile einer besseren Dosierbarkeit und höheren applizierbaren Proteinmenge bietet, bei der Verfütterung des Protein-Rohextraktes aber gegebenenfalls eine längere Verweildauer der Proteine in der Mücke erreicht werden kann. In den folgenden Fütterungsexperimenten mit infizierten *Anopheles* wurden daher sowohl das Blattmaterial als auch die mittels *Profinia*<sup>TM</sup>-System gereinigten Proteine verwendet.

### 3.6.2 Beurteilung der inhibitorischen Wirksamkeit der Kandidatenproteine in Fütterungsexperimenten an mit *Plasmodium berghei* infizierten *Anopheles stephensi*

Die Fütterungsexperimente an mit *P. berghei* infizierten *Anopheles stephensi* wurden in der Arbeitsgruppe von Gabriele Pradel am Zentrum für Infektionsforschung (ZINF) der Julius-Maximilians-Universität Würzburg von Matthias Scheuermayer und Che Julius Ngwa durchgeführt. Daher wird hier auf die von ihnen erhaltenen Daten Bezug genommen.

Die Expression der Proteine erfolgte wie zuvor beschrieben entweder im pflanzlichen oder im bakteriellen Expressionssystem. Für die Untersuchungen an infizierten *A. stephensi* wurden neben den aus dem Blattmaterial von *N. benthamiana* gewonnenen Rohextrakten auch die mittels IMAC gereinigten und entsalzten Proteinlösungen verwendet.

Als Test-System der inhibitorischen Wirksamkeit diente der Maus-Malaria-Erreger *Plasmodium berghei*. Die zu testenden Proteine wurden den Moskitos zunächst als Zuckermahlzeit (5 ml Proteinlösung versetzt mit 10 % (w/v) Saccharose) zwei Tage auf einem Wattepad angeboten, welches einmal täglich erneuert wurde. Anschließend erhielten die Moskitos eine Blutmahlzeit an einer mit *Plasmodium berghei* infizierten Maus (15 Minuten, 1 bis 10 % Parasitämie). Die inhibitorische Wirksamkeit wurde durch das Auszählen der Oocysten im Mitteldarm der Mücke 7 bis 12 Tage nach der Infektion (*post infection*, p. i.; Abb. 3.50) und/oder der Sporozoiten in der Speicheldrüse mindestens 14 Tage p. i. bestimmt.

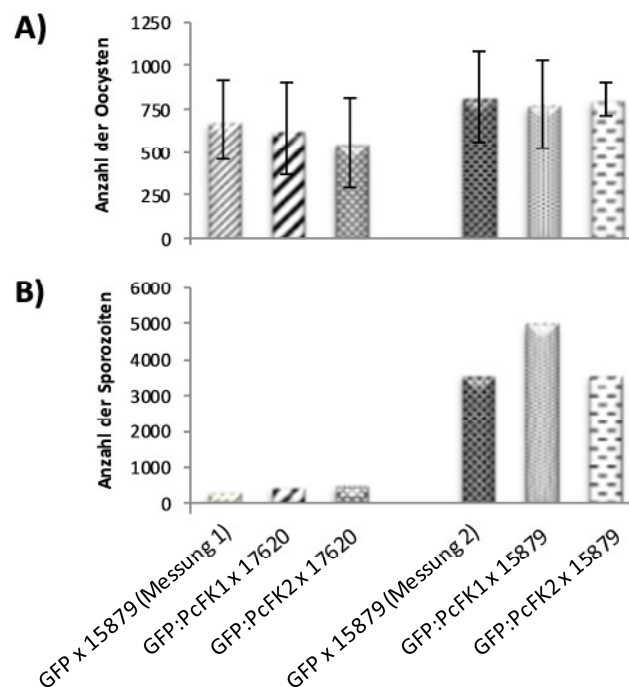


**Abbildung 3.50.** Lichtmikroskopische Aufnahme der Oocysten von *Plasmodium berghei* im Mitteldarmepithel von *Anopheles stephensi*. Die mit Mercurochrom angefärbten Oocysten sind als orangefarbene, kreisrunde Einheiten zu erkennen (rote Pfeile). Bild: Matthias Scheuermayer.



### 3.6.2.1 Inhibitorische Wirksamkeit von GFP:PcFK1 und GFP:PcFK2

In einem ersten Experiment wurden den infizierten Moskitos die Rohextrakte (Kap. 2.2.5.1) von GFP:PcFK1- und GFP:PcFK2-exprimierenden *N. benthamiana*-Pflanzen als potentielle transmissionsblockierende Kandidatenproteine angeboten. Als Negativ-Kontrolle diente der Rohextrakt von GFP-exprimierenden *N. benthamiana*-Pflanzen. Dabei wurde jeweils Blattmaterial verwendet, bei dem die Akkumulation der Zielproteine im Cytosol (Verwendung des 5'-Provektor-Moduls pICH15879) bzw. im Apoplasten (Verwendung des 5'-Provektor-Moduls pICH17620) erfolgte. Für die Herstellung des Rohextraktes wurden 15 g (GFP) bzw. 20 g (GFP:PcFK1- und GFP:PcFK2) zermörstertes Blattmaterial mit 100 ml Pufferlösung extrahiert und anschließend filtriert (Kap. 2.2.5.1). Zur Sicherstellung der Aufnahme der angebotenen Lösung durch die Moskitos wurde das Filtrat mit 10 % (w/v) Saccharose versetzt. Ein Wattepad wurde mit 5 ml der so erhaltenen Lösung getränkt und einem Mückenkollektiv von 50 bis 100 Weibchen etwa 48 Stunden angeboten, wobei diese zuvor für mindestens 24 Stunden ausgehungert worden waren. Nach 24 Stunden wurde das Pad mit frischer Proteinelösung getränkt. Nach der Infektion der Moskitos erfolgten 10 bis 12 Tage später die Präparation der Mitteldärme sowie die Auszählung der enthaltenen Oocysten (Abb. 3.51 A). Die Speicheldrüsen der Moskitos wurden 17 bis 20 Tage nach der Fütterung isoliert und hinsichtlich der Anzahl an Sporozoiten untersucht (Abb. 3.51 B).



**Abbildung 3.51. Graphische Darstellung der Ergebnisse der Fütterung von mit *P. berghei* infizierten *Anopheles stephensi* mit *N. benthamiana*-Rohextrakten von GFP, GFP:PcFK1 und GFP:PcFK2.** Von GFP:PcFK1 und GFP:PcFK2 wurde jeweils sowohl das cytosolisch als auch das apoplastisch exprimierte Protein getestet. Dargestellt sind die durchschnittliche Anzahl an Oocysten in den präparierten Mitteldärmen (A) sowie die Anzahl an Sporozoiten pro Speicheldrüsen-Lappen (B). Weitere Erklärungen sind dem Text zu entnehmen.



Wie in Abbildung 3.51 A zu erkennen, unterscheiden sich die einzelnen mit den verschiedenen Rohextrakten gefütterten Mückenkollektive hinsichtlich der Anzahl an Oocysten im Mitteldarm nicht signifikant. Die Entwicklung der Oocysten wurde in diesem Fütterungsversuch unter den gewählten Bedingungen demnach durch GFP:PcFK1 oder GFP:PcFK2 nicht inhibiert. Vergleicht man jedoch die Anzahl der Sporozoiten der einzelnen Mückenkollektive (Abb. 3.51 B), so scheinen die apoplastisch exprimierte Proteine gegenüber den im Cytosol akkumulierten Proteinen eine (bessere) inhibitorische Wirksamkeit zu zeigen. Bewertet man die Ergebnisse wiederum jedoch in Abhängigkeit von der gleichzeitig verfütterten Negativ-Kontrolle (GFP), so konnte durch die Applikation von GFP:PcFK1 oder GFP:PcFK2, unabhängig von der Lokalisation der Akkumulation der exprimierten Proteine, unter den gegebenen Versuchsbedingungen keine Inhibition der *Plasmodium*-Entwicklung gezeigt werden.

### 3.6.2.2 Inhibitorische Wirksamkeit der SM1-Peptid-Varianten

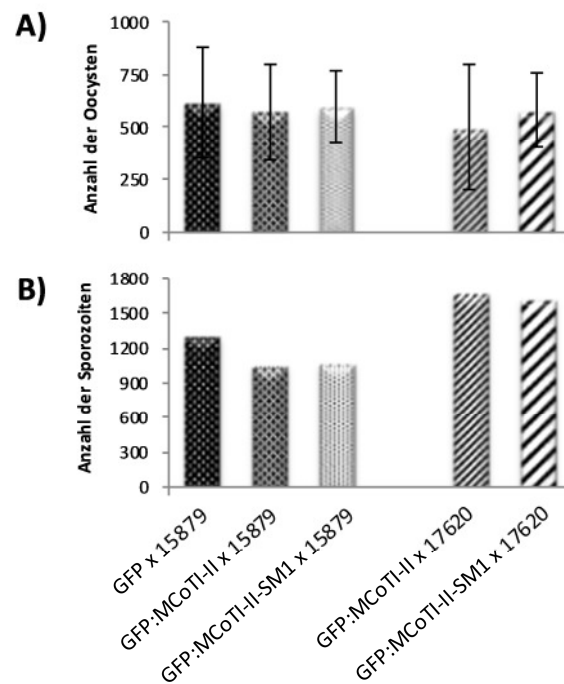
#### 3.6.2.2.1 Inhibitorische Wirksamkeit von GFP:MCoTI-II-SM1

In einem weiteren Fütterungsexperiment wurde das Fusionsprotein GFP:MCoTI-II-SM1 hinsichtlich seines inhibitorischen Potentials auf *Plasmodium* getestet, wobei sowohl GFP als auch GFP:MCoTI-II als Negativ-Kontrollen dienten.

Die Expression der Proteine erfolgte in *N. benthamiana* unter der Verwendung der 5'-Provektor-Module pICH15879 und pICH17620 zur Akkumulation der Proteine im Cytosol der Pflanzenzelle bzw. im Apoplasten. Die Durchführung des Fütterungsexperimentes erfolgte wie zuvor beschrieben, wobei hier jedoch die mittels IMAC aus dem Blattmaterial von *N. benthamiana* gereinigten und entsalzten Proteinlösungen verwendet wurden (Kap. 3.1.2.2). Diese wurden wiederum mit 10 % (w/v) Saccharose versetzt. Die Konzentration an rekombinantem Protein in den verfütterten Lösungen betrug etwa 0.5 mg/ml. Der inhibitorische Effekt der SM1-Peptid-Variante wurde abermals durch die Bestimmung der Anzahl an Oocysten im Mitteldarm ca. 9 Tage nach der Infektion und der Anzahl an Sporozoiten in der Speicheldrüse nach etwa 17 Tagen untersucht (Abb. 3.52).

Abbildung 3.52 zeigt, dass die mittlere Anzahl an Oocysten im Mitteldarm der Moskitos bei den einzelnen mit den verschiedenen Proteinlösungen gefütterten Kollektiven etwa gleich hoch ist. Ähnliches gilt für die Anzahl an Sporozoiten, wobei sich hier vor allem die Werte für GFP:MCoTI-II und GFP:MCoTI-II-SM1 kaum unterscheiden.

Dem als GFP-Fusion applizierten SM1-Peptid konnte hier demnach keine signifikante inhibitorische Wirksamkeit nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.52. Graphische Darstellung der Ergebnisse der Fütterung von mit *P. berghei* infizierten *Anopheles stephensi* mit den mittels IMAC gereinigten Proteinen GFP, GFP:MCoTI-II und GFP:MCoTI-II-SM1.** Von GFP:MCoTI-II und GFP:MCoTI-II-SM1 wurde jeweils sowohl das cytosolisch als auch das apoplastisch exprimierte Protein getestet. Dargestellt sind die durchschnittliche Anzahl an Oocysten in den präparierten Mitteldärmen (A) sowie die Anzahl an Sporozoiten pro Speicheldrüsen-Lappen (B). Weitere Erklärungen im Text.

### 3.6.2.2.2 Inhibitorische Wirksamkeit von TRX:MCoTI-II-SM1, TRX:AGRP-SM1 und TRX:[SM1]<sub>8</sub>

Nachdem bisher noch keine inhibitorische Wirksamkeit für die getesteten Proteine nachgewiesen werden konnte, wurde vermutet, dass möglicherweise durch die Fusion mit dem recht großen Fusionspartner GFP einerseits der applizierte Anteil an inhibitorischem Peptid zu gering, andererseits das Fusionsprotein in seiner Bindekapazität eingeschränkt sein könnte. Da zuvor weitere, verschiedene Varianten des SM1-Peptids erzeugt worden waren (Kap. 3.1), wurden einige dieser Varianten nun für nachfolgende Fütterungsexperimente herangezogen.

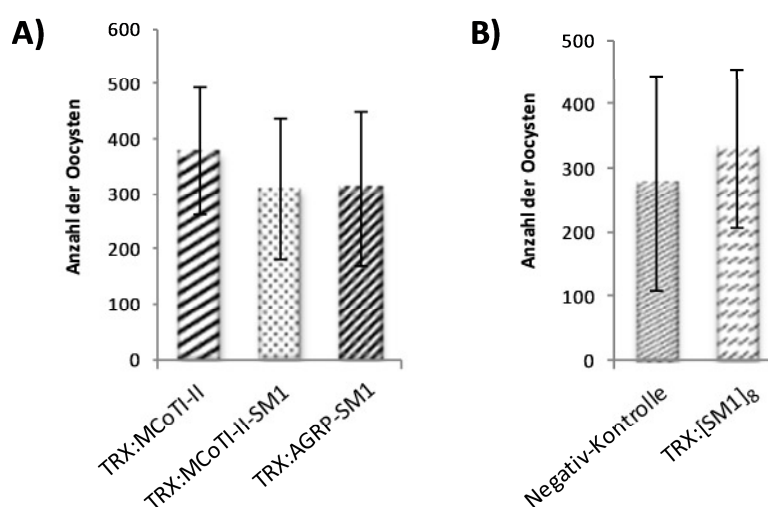
So wurden zunächst die bakteriell im pET-System exprimierten Mikroprotein-Fusionen TRX:MCoTI-II-SM1 und TRX:AGRP-SM1 (Kap. 3.1.3) getestet, wobei TRX:MCoTI-II als Negativ-Kontrolle diente. Der Fusionspartner Thioredoxin sollte sich hier, neben seiner im Vergleich zu GFP geringeren Größe, durch die Begünstigung der Ausbildung der Disulfidbrücken auch positiv auf die Faltung der Proteine auswirken.

Die Proteine wurden wie zuvor erläutert in *E. coli* Origami (DE3) exprimiert und mittels IMAC aufgereinigt (Kap. 3.1.3.1). Die Durchführung des Fütterungsexperimentes erfolgte wie zuvor beschrieben. Die gereinigten und entsalzten Proteinlösungen wurden wiederum mit 10 % (w/v) Saccharose versetzt, wobei die Konzentration an rekombinantem Protein in den applizierten Lösungen etwa 0.5 mg/ml betrug. Neun Tage p. i. wurde durch die Auszählung der Oocysten das

inhibitorische Potential der Peptide bestimmt. Auf die Auszählung der Sporozoiten wurde verzichtet (Abb. 3.53).

Wie Abbildung 3.53 A zeigt, konnte zwar eine geringe Reduktion der mittleren Oocystenzahlen sowohl bei MCoTI-II-SM1 als auch bei AGRP-SM1 im Vergleich zur Kontrolle erreicht werden, das Ausmaß der Reduktion war jedoch nicht signifikant.

Damit zeigten auch die SM1-Peptid-Varianten MCoTI-II-SM1 und AGRP-SM1 unter den gegebenen Bedingungen keine inhibitorische Wirkung auf *Plasmodium*.



**Abbildung 3.53.** Graphische Darstellung der Ergebnisse der Fütterung von mit *P. berghei* infizierten *Anopheles stephensi* mit den mittels IMAC gereinigten Proteinen TRX:MCoTI-II, TRX:MCoTI-II-SM1 und TRX:AGRP-SM1 (A), sowie TRX:[SM1]<sub>8</sub> (B). Dargestellt ist die durchschnittliche Anzahl an Oocysten in den präparierten Mitteldärmen. Weitere Erklärungen im Text.

In einem nachfolgenden Experiment wurde daher als eine weitere SM1-Peptid-Variante das bakteriell exprimierte oktamere SM1-Peptid (TRX:[SM1]<sub>8</sub>) verwendet. Als Negativ-Kontrolle fungierte hier eine Zuckerlösung ohne zu testendes Protein.

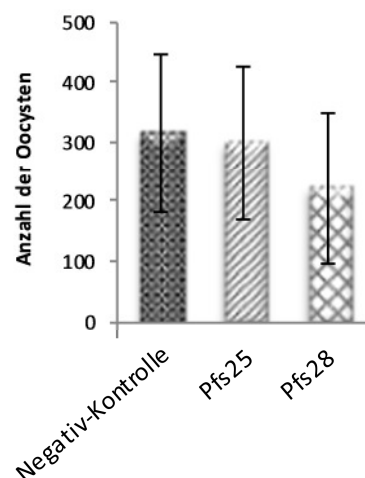
Sowohl die Expression in *E. coli* Origami(DE3) und die Reinigung der zu testenden SM1-Variante mittels IMAC, als auch die Durchführung des Fütterungsversuches erfolgten wie zuvor beschrieben. Der Gehalt an rekombinantem Protein in der verfütterten Zuckerlösung betrug abermals etwa 0.5 mg/ml. Die Präparation der Mitteldärme zur Bestimmung der mittleren Anzahl an enthaltenen Oocysten wurde neun bis zehn Tage p. i. durchgeführt. Die Sporozoitenzahl wurde nicht bestimmt.

Abbildung 3.53 B zeigt die Wirkung auf die Entwicklung von *Plasmodium*. Auch diese SM1-Variante besitzt unter den gegebenen Bedingungen keinen inhibitorischen Effekt auf die Bildung der Oocysten und damit auf den Lebenszyklus des Parasiten innerhalb der Mücke.

### 3.6.2.3 Inhibitorische Wirksamkeit der plasmodialen Antigene Pfs25 und Pfs28

Einen zusätzlichen Ansatzpunkt neben den zuvor getesteten potentiell inhibitorischen Peptiden zur Unterbrechung oder Blockade des Lebenszyklus von *Plasmodium* in der Mücke können parasitäre Antigene der frühen Moskito-Stadien darstellen. Dabei können diese nicht nur als Antikörpertarget dienen, sondern die rekombinant produzierten Antigene könnten nach der Applikation in einem weiteren Fütterungsexperiment als sogenannte kompetitive Antagonisten die für den Fortschritt der Entwicklung von *Plasmodium* benötigten Strukturen blockieren. Diese Überlegung bildete die Grundlage für das folgende Fütterungsexperiment an *Anopheles stephensi*.

Dabei wurden die bakteriell in *E. coli* BL21(DE3) exprimierten Proteine Pfs25 und Pfs28 (Kap. 3.4) verwendet, die mittels IMAC gereinigt und entsalzt worden waren (Kap. 3.4.2.1). Als Negativ-Kontrolle diente die Zuckerlösung ohne zu testendes rekombinantes Protein. Das Fütterungsexperiment wurde unter den zuvor beschriebenen Bedingungen durchgeführt, wobei der Proteingehalt der verfütterten Lösungen diesmal mit etwa 0.3 mg/ml etwas niedriger als bisher war. Nach etwa 11 Tagen erfolgte zur Beurteilung einer inhibitorischen Wirkung die Bestimmung der mittleren Oocystenzahl in den zuvor präparierten Mitteldärmen.



**Abbildung 3.54. Graphische Darstellung der Ergebnisse der Fütterung von mit *P. berghei* infizierten *Anopheles stephensi* mit den mittels IMAC gereinigten Proteinen Pfs25 und Pfs28.** Dargestellt ist die durchschnittliche Anzahl an Oocysten in den präparierten Mitteldärmen. Weitere Erklärungen im Text.

Wie Abbildung 3.54 veranschaulicht konnte hier unter den gewählten Versuchsbedingungen durch die Applikation von Pfs25 und Pfs28 keine signifikante Reduktion der Oocysten erreicht werden. Da allerdings die Expression und Akkumulation der beiden Proteine noch verbesserungswürdig erscheint und auch mit der Expression in BL21-Zellen vermutlich nicht das optimale Produktionssystem gewählt wurde, erscheint nach der Optimierung der Expressionsbedingungen auch eine Wiederholung des Experimentes sinnvoll.

---

Darüber hinaus konnten im Rahmen dieser Arbeit zwar weitere zu testende, potentiell inhibitorische Peptid-Varianten zur Verfügung gestellt werden, weitere *Anopheles*-Fütterungsexperimente konnten aufgrund der äußerst aufwendigen Versuchsdurchführung jedoch nicht vorgenommen werden. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die unter den gegebenen Versuchsbedingungen erhaltenen Ergebnisse zur inhibitorischen Wirksamkeit der getesteten Proteine auf die beschränkten Versuchskapazitäten und –modalitäten zurückzuführen sind.



## 4. Diskussion

Malaria ist heute eine Krankheit der ärmeren und unterentwickelten Länder. Gerade in Afrika bleibt die Mortalität auch deswegen so hoch, da vor allem in entlegenen Dörfern der Zugang zu medizinischer Versorgung nur bedingt gegeben ist (Miller *et al.*, 2002). Für den Kampf gegen diese Krankheit ist daher neben den bereits vorhandenen Mitteln (Bettnetze, Wohnraumbesprühung mit Insektiziden, Anti-Malaria-Therapeutika) ein noch besseres Verständnis der Biologie des Erregers, seines Vektors und die Bereitstellung neuer Ansätze unabdingbar. Dabei ist neben einer effektiven Impfung vor allem im Hinblick auf die zunehmende Resistenzentwicklung die Prävention der Übertragung von größter Wichtigkeit.

Mit der Gründung zahlreicher internationaler Initiativen und der Aufstockung der Fördergelder wurde der Kampf gegen die Malaria in den letzten Jahren wiederbelebt. So befinden sich dank massiver finanzieller Unterstützung nicht nur mehrere Impfstoffkandidaten in der Entwicklung bzw. bereits in klinischen Studien (Carter, 2001; Schwartz *et al.*, 2012; Tsuboi *et al.*, 2003), sondern auch innovative Projekte zur Verwirklichung neuer Strategien können verfolgt werden, die angesichts zahlreicher Rückschläge bei der Anwendung etablierter Maßnahmen immer wichtiger werden. Dabei rückt die Bekämpfung der Sexualstadien von *Plasmodium* innerhalb des Moskitos durch sogenannte *transmission blocking vaccines* (TBVs) zunehmend in den Fokus. Während der Parasit im menschlichen Wirt verschiedene Strategien besitzt, um dem Immunsystem zu entgehen und seine Entwicklung zu vollenden, ist er während der Passage des Mitteldarms von *Anopheles* und der Sporogoniestadien besonders verwundbar. Hier ist *Plasmodium*, anders als im menschlichen Wirt, für mehrere Stunden extrazellulär angreifbar (Carter *et al.*, 2000; Kaslow, 1997). Gleichmaßen wichtig ist jedoch auch die Identifizierung der Liganden innerhalb des Moskitos, mit denen der Parasit interagiert und deren Blockade durch die Unterbrechung des Entwicklungszyklus die Transmission von *Plasmodium* verhindern könnte.

In den letzten Jahren wurden verschiedene Peptide, Proteine und Antikörper beschrieben, die als TBVs mit den Sexualstadien von *Plasmodium* bzw. bestimmten Strukturen innerhalb der Stechmücke interagieren und in der Folge die Übertragung des Parasiten von der Mücke auf den Menschen reduzieren können. Diese Arbeit sollte durch die Produktion antiplasmodialer Peptide bzw. plasmodialer Antigene sowie deren Evaluation in Fütterungsexperimenten mit *Anopheles* und Expression in einem geeigneten pflanzlichen Applikationssystem als Alternative zu TBVs die Grundlagen für einen alternativen Ansatz schaffen, der letztendlich dazu beitragen könnte, zusammen mit traditionellen und bereits etablierten Strategien die Transmission der Malaria zu senken.

Tabelle 4.1 gibt noch einmal einen Überblick über die entsprechenden Kandidatenproteine.

Tabelle 4.1: Übersicht der erzeugten Varianten mit Angabe des verwendeten Expressionssystems und der in dieser Arbeit untersuchten Funktion.

Kandidaten-proteine	Varianten	Expressionssystem	untersuchte Funktion
<b>MCoTI-II</b>	MCOTI001	<i>N. benthamiana</i>	
	TRX:MCoTI-II	<i>E. coli</i> Origami(DE3)	CKM/scaffold
	GFP:MCoTI-II	<i>N. benthamiana</i>	
<b>MCoTI-II-SM1</b>	MCOTI002	<i>N. benthamiana</i>	
	TRX:MCoTI-II-SM1	<i>E. coli</i> Origami(DE3)	Inhibitor
	GFP:MCoTI-II-SM1	<i>N. benthamiana</i>	
<b>AGRP-SM1</b>	TRX:AGRP-SM1	<i>E. coli</i> Origami(DE3)	Inhibitor
	GFP:AGRP-SM1	<i>N. benthamiana</i>	
<b>[SM1]<sub>8</sub></b>	TRX:[SM1] <sub>8</sub>	<i>E. coli</i> Origami(DE3)	Inhibitor
	[SM1] <sub>8</sub>	<i>N. benthamiana</i>	
<b>PcFK1</b>	TRX:PcFK1	<i>E. coli</i> Origami(DE3)	Inhibitor
	GFP:PcFK1	<i>N. benthamiana</i>	
<b>PcFK2</b>	TRX:PcFK2	<i>E. coli</i> Origami(DE3)	Inhibitor
	GFP:PcFK2	<i>N. benthamiana</i>	
<b>PbTRAP-Ado</b>	PbTRAP-Ado	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Antikörpertarget
	PbTRAP-Ado	<i>N. benthamiana</i>	
	TRX:PbTRAP-Ado	<i>E. coli</i> Origami(DE3)	
<b>Saglin_syn</b>	Saglin_syn	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Antikörpertarget
	TRX:Saglin_syn	<i>E. coli</i> Origami(DE3)	
<b>Pfs25</b>	Pfs25	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Antikörpertarget/ komp. Inhibitor
	TRX:Pfs25	<i>E. coli</i> Origami(DE3)	
<b>Pfs28</b>	Pfs28	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Antikörpertarget/ komp. Inhibitor
	TRX:Pfs28	<i>E. coli</i> Origami(DE3)	



## 4.1 Produktion potentiell inhibitorischer Kandidatenproteine und plasmodialer Antigene im bakteriellen und pflanzlichen Expressionssystem

### 4.1.1 Produktion der SM1-Peptid-, PcFK1- und PcFK2-Varianten

Ghosh *et al.* identifizierten im Jahre 2001 mithilfe einer Phagenbibliothek ein synthetisches Dodecapeptid, das *salivary gland and midgut peptide 1* (SM1), das mit hoher Affinität sowohl an die luminal Seite des Mitteldarmepithels als auch an die distalen Speicheldrüsenlappen von *Anopheles stephensi* bindet (Ghosh *et al.*, 2001). Kurze Zeit später gelang es Ito *et al.*, transgene Moskitos zu erzeugen, die das SM1-Peptid exprimierten und in das Mitteldarm-Lumen sezernierten, und zu zeigen, dass damit eine Inhibition der Oocysten-Bildung bewirkt und so die Transmissionsrate signifikant gesenkt werden konnte (Ito *et al.*, 2002). Ein Nachteil in der praktischen Anwendung dieses Ansatzes ist es jedoch, dass für eine ausreichende Wirksamkeit die modifizierten Moskitos ihre wilden Artgenossen verdrängen müssten, so dass die entsprechenden Gene von der einen zur nächsten Generation vererbt werden können. Dieser Vorgang müsste sich darüber hinaus entsprechend schnell vollziehen, so dass der Parasit keine Resistenzmechanismen entwickeln kann. Da dies kaum zu erreichen ist, wurde nach weiteren Möglichkeiten gesucht, antiplasmodiale Proteine im Moskito zu akkumulieren.

In diesem Zusammenhang stellte sich daher die Frage, ob unter Verwendung des SM1-Peptids, für welches also gezeigt werden konnte, dass es in o. g. Ansatz die Übertragung von *Plasmodium* von der Stechmücke auf die Maus effizient blockieren kann, dieser Effekt auch durch einfache orale Applikation mit einem geeigneten System erzielt werden könnte. Dabei könnte das gewählte Applikationssystem in der Folge ebenfalls zur Applikation weiterer inhibitorischer Proteine oder Antikörper genutzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte in Fütterungsexperimenten mit *Anopheles stephensi* einerseits die Wirksamkeit auf *Plasmodium berghei* nach oraler Applikation untersucht und andererseits gleichzeitig ein geeignetes Applikationssystem für die potentiell inhibitorischen Proteine gefunden und getestet werden.

Das nur zwölf Aminosäuren große SM1-Peptid wurde daher in die Cystin-Knoten-Mikroproteine (CKM) MCoTI-II und AGRP integriert. Cystin-Knoten-Mikroproteine besitzen durch ihre besondere Struktur, die durch die charakteristische Verknüpfung sechs konservierter Cystein-Reste zu einem sogenannten Cystin-Knoten-Motiv gebildet wird, eine hohe chemische, thermische und proteolytische Stabilität. Diese macht sie zu idealen Grundgerüsten für die Insertion funktionaler Peptide. Durch die Integration in die CKM MCoTI-II bzw. AGRP sollte hier dem SM1-Peptid die nötige Stabilität für eine verlängerte Verweilzeit im Mitteldarm von *Anopheles* verliehen werden. Für die nachfolgenden Anwendungen wurden dabei verschiedene Varianten erzeugt.

Darüber hinaus wurde eine oktamere Variante des SM1-Peptids generiert, die sich zuvor in Untersuchungen durch Fang *et al.* als wirkungsvoll erwiesen hatte: Durch die Entwicklung rekombinanter Stämme von *Metarhizium anisopliae*, die die oktamere Variante des SM1-Peptids

exprimierten, konnte in Infektionsmodellen mit *Anopheles* die Zahl der Sporozoiten von *Plasmodium* in der Speicheldrüse um über 70 % gesenkt werden (Fang *et al.*, 2011).

Als weitere inhibitorische Kandidatenproteine zur Untersuchung der breiteren Anwendbarkeit dieses Ansatzes wurden Varianten von PcFK1 und PcFK2, den antiplasmodial wirksamen Peptiden aus dem Toxin der Tarantel *Psalmopoeus cambridgei*, generiert. PcFK1 und PcFK2, die beide drei Disulfidbrücken besitzen und zur Inhibitor Cystein-Knoten (ICK)-Superfamilie gehören, zeigten *in vitro* starke antiplasmodiale Wirksamkeit gegen die intra-erythrozytären Stadien von *Plasmodium falciparum* (Choi *et al.*, 2004; Pimentel *et al.*, 2006). Da der molekulare Angriffspunkt und Wirkmechanismus nicht bekannt sind, sollte hier geklärt werden, ob sie sich nicht auch bei dem oben erläuterten Ansatz als wirksam erweisen würden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten diese Peptide als potentiell inhibitorische Kandidatenproteine gewonnen werden, um in Fütterungsexperimenten an *Anopheles stephensi* den inhibitorischen Effekt der Peptide auf *Plasmodium berghei* untersuchen zu können.

Dabei wurden verschiedene Expressionssysteme gewählt. So erfolgte neben der bakteriellen heterologen Expression in *E. coli* unter Verwendung des pET-Systems die Produktion der Proteine auch transient in *Nicotiana benthamiana* mit dem von der Firma *ICON Genetics* (Halle/Saale) entwickelten viralen System (Marillonnet *et al.*, 2004; Marillonnet *et al.*, 2005). Dieses bietet die Vorteile eines pflanzlichen Expressionssystems ohne dabei jedoch langwieriger Regenerationszyklen, wie sie bei Kern- oder Chloroplastentransformation typisch sind, zu bedürfen. So kann dieses System neben dem bakteriellen Expressionssystem hier nicht nur zur schnellen Generierung großer Mengen Protein verwendet werden, sondern auch als Indikator bezüglich der Funktionalität der produzierten Proteine für die stabile und wesentlich aufwendigere Transformation von *Ricinus communis* dienen.

#### **4.1.1.1 Transiente Expression in *N. benthamiana* in Abhängigkeit vom subzellulären Targeting**

Wie zuvor beschrieben stellt die transiente Expression von Transgenen unter Verwendung viraler Vektoren eine Alternative zu den stabilen Transformationsmethoden dar (Kap. 1.5). Das hier verwendete magnICON®-System von *ICON Genetics* (Marillonnet *et al.*, 2004; Marillonnet *et al.*, 2005) basiert auf der *in planta*-Assemblierung funktionaler viraler Vektoren aus einzelnen Provektor-Modulen. Statt des gesamten Vektors werden dabei *Agrobacterium*-vermittelt einzelne Module des viralen Vektors und des Transgens in die Pflanzenzelle eingebracht, wo sie mit Hilfe einer spezifischen Rekombinase zu einem transkribierbaren Amplikon zusammengefügt werden.

Nach der Klonierung der verschiedenen Konstrukte und Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 wurde unter Verwendung der 5'-Pro-Vektor-Module pICH15879 und pICH17620 des *ICON*-Systems eine Akkumulation der Proteine im Cytosol bzw. Apoplasten von *N. benthamiana* ermöglicht (Tab. 4.2). Die Entwicklung der infiltrierten Pflanzen variierte hier jedoch sowohl innerhalb der Pflanzenpopulation als auch zwischen verschiedenen Infiltrationsereignissen und Konstrukten stark. Daher war es erforderlich, dasselbe Konstrukt

mehrere Male zu infiltrieren, wobei ein Zusammenhang zwischen bestimmten Konstrukten oder der Transgenexpression und dem Welken der infiltrierten Pflanzen aber nicht hergestellt werden konnte. Daher ist davon auszugehen, dass die Vitalität der infiltrierten Pflanzen hauptsächlich durch die vorausgegangenen Kultivierungsbedingungen und gegebenenfalls durch das Alter der Pflanzen zum Zeitpunkt der Infiltration determiniert wurde.

Für alle infiltrierten Varianten wurde mittels Immunoblot eine Proteinakkumulation im Cytosol bzw. im Apoplasten nachgewiesen. Diese zeigte allerdings zwischen den einzelnen Infiltrationsereignissen der verschiedenen Varianten starke Schwankungen, wobei eine mögliche Ursache hier wohl wiederum in der Vitalität und Entwicklung der Pflanzen nach der Infiltration zu finden ist. Zusammenfassend konnte aber bei Verwendung des 5'-Pro-Vektor-Moduls pICH15879 ohne Targeting-Peptid und Akkumulation im Cytosol eine etwas höhere Proteinakkumulation als bei Koinfiltration mit dem 5'-Pro-Vektor-Modul pICH17620 mit Apoplast-Targeting-Präsequenz detektiert werden.

Das Zellkompartiment, in dem ein rekombinantes Protein akkumuliert wird, beeinflusst dabei nicht nur seine Faltung, sondern auch seine Assemblierung oder posttranslationale Modifikation und spielt daher eine wichtige Rolle für die Stabilität und die akkumulierbare Menge des Proteins (Twyman *et al.*, 2003). Dies ergibt sich höchstwahrscheinlich aus den spezifischen Unterschieden hinsichtlich Redox-Potential, pH-Wert und der An- bzw. Abwesenheit spezifischer molekularer Chaperone und Foldasen, Glycosyltransferasen sowie proteolytischer Enzyme (Teh & Kavanagh, 2010; Doran, 2006; Benchabane *et al.*, 2008). Das Endoplasmatische Retikulum (ER) bietet eine oxidierende Umgebung und eine Fülle an molekularen Chaperonen, wobei gleichzeitig nur wenige Proteasen vorhanden sind, was wohl die wichtigsten Faktoren für eine korrekte Proteinfaltung sein dürften (Twyman *et al.*, 2003). Untersuchungen zur Expression von Antikörpern und Antikörperfragmenten in *Nicotiana tabacum* zeigten beispielsweise, dass der sekretorische Weg (ER/Apoplast) eine korrekte Faltung durch die Ausbildung von Disulfidbrücken begünstigte und daher auch hinsichtlich der Akkumulationsrate vorteilhafter als das Cytosol war (Conrad & Fiedler, 1998; Schillberg *et al.*, 1999).

Fehlt ein ER-Retentionssignal (C-terminales Tetrapeptid H/KDEL) wird das exprimierte Protein weiter in den Apoplasten transportiert, wobei beschrieben wurde, dass die Akkumulationsrate mit H/KDEL-Sequenz noch gesteigert werden konnte (Conrad & Fiedler, 1998; Twyman *et al.*, 2003). Im Apoplasten konnten bereits eine Reihe rekombinanter Proteine wie z. B. das humane Wachstumshormon (Gils *et al.* 2005), *Yersinia pestis*-Antigene (Santi *et al.* 2006) und Rinder-Aprotinin (Badri *et al.* 2009) mit sehr guter Ausbeute akkumuliert werden (Badri *et al.*, 2009; Gils *et al.*, 2005; Santi *et al.*, 2006). Obwohl das Cytosol der Pflanzenzelle in diesem Zusammenhang als weniger geeignet erscheint, können auch hier große Mengen Protein akkumuliert werden. So beschrieben Webster *et al.* (2009) die Expression von *Plasmodium yoelii* MSP4/5 (PyMSP4/5) in *N. benthamiana* unter Verwendung des magnICON®-Systems, wobei eine maximale Ausbeute mit einer Kodon-optimierten Sequenz bei Akkumulation im Cytosol erzielt wurde (bis zu 10 % des LGP oder 2 mg/g FG). Durch orale Verabreichung des entsprechenden Blattmaterials zusammen

mit einem Adjuvans konnten darüber hinaus im Mausmodell spezifische Antikörper induziert werden (Webster *et al.*, 2009).

Im Allgemeinen lässt sich kaum vorhersagen, in welchem Kompartiment der Pflanzenzelle eine höhere Proteinakkumulation erzielt werden kann (Santi *et al.*, 2006). So beobachteten beispielsweise Webster *et al.* im schon oben beschriebenen Beispiel für die Expression des PyMSP4/5 in *N. benthamiana* eine maximale Ausbeute bei Akkumulation im Cytosol (Webster *et al.*, 2009). Interessanterweise konnte die gleiche Gruppe zeigen, dass bei der Expression eines strukturell ähnlichen Proteins, *Plasmodium yoelii* MSP1<sub>19</sub>, unter Verwendung desselben Systems die beste Akkumulationsrate im Apoplasten erreicht werden konnte (Ma *et al.*, 2012). Dies macht deutlich, dass auch für strukturverwandte Proteine empirische Untersuchungen zur optimalen Expression und Lokalisation notwendig sein können (Ma *et al.*, 2012).

Da hier die Akkumulation im *N. benthamiana*-Blattmaterial für alle infiltrierten Varianten gezeigt werden konnte, wurde dieses zur Reinigung der rekombinanten Proteine mittels IMAC verwendet. Die erhaltenen Eluatfraktionen wurden im Anschluss an die Reinigung elektrophoretisch analysiert bzw. die gereinigten Proteine mittels Immunoblot detektiert. Die Menge an gewonnenem Protein variierte dabei stark und war bei konstantem Materialeinsatz nicht nur vom 3'-Pro-Vektor-Modul sondern wiederum vom Infiltrationsereignis abhängig. Insgesamt zeigte sich außerdem, dass das Eluat noch Verunreinigungen, insbesondere RuBisCo, enthalten konnte. Da die Reinheit der erhaltenen Proteinlösungen aber angesichts der geplanten späteren Applikationen als ausreichend betrachtet wurde, wurde zugunsten einer höheren Proteinausbeute von einer Verbesserung der Reinheit der Proteinlösungen abgesehen.

Neben PcFK1 und PcFK2 lieferte die oktamere SM1-Peptid-Variante dabei recht niedrige Proteinmengen. Da sich für das SM1-Peptid hier jedoch insbesondere die Reinigung als schwierig darstellte, bleibt daher zu prüfen, ob durch Modifikationen des Extraktions- bzw. Aufreinigungsprotokoll, z. B. durch den Zusatz eines Detergens zum Extraktionspuffer, eine Verbesserung der Proteinausbeute zu erreichen wäre. Auffällig war hier auch der verhältnismäßig hohe Anteil an Di- bzw. Oligomeren, was auf freie SH-Gruppen und damit auf eine unvollständige Faltung hindeutet. Sollte darüber hinaus der zur Affinitätsreinigung eingebrachte C-terminale Hexa-Histidin-Rest durch eine entsprechend ungünstige Faltung des Proteins der Bindung an die Säulenmatrix nicht oder nur schlecht zugänglich sein, könnte die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen, z. B. unter Verwendung von Harnstoff, das gewünschte Ergebnis erzielen. Allerdings müsste dann nach der Reinigung *in vitro* die Renaturierung des isolierten Proteins erfolgen. Weiterhin bleibt demnach zu klären, ob hier eine Akkumulation im Apoplasten durch die Begünstigung der Ausbildung von Disulfidbrücken zu einer höheren Menge an korrekt gefaltetem Protein und somit insgesamt zu einer höheren Proteinausbeute führte.

Allerdings beeinflussen auch andere Faktoren als das subzelluläre Targeting die Akkumulationsrate (Doran, 2006). So kann gegebenenfalls eine Kodon-Optimierung der zu exprimierenden Sequenz nötig sein (Kirby & Kavanagh, 2002; Teh & Kavanagh, 2010). Durch Kodon-Optimierung werden fremde Gensequenzen für den produzierenden Organismus unter

Beibehaltung der Aminosäuresequenz entsprechend modifiziert, um eine ausreichende Verfügbarkeit der jeweiligen tRNA zu gewährleisten. Dies kann insbesondere für Antigene von Organismen mit einem ungewöhnlichen AT-Gehalt oder *codon usage* – wie *Plasmodium* – von Bedeutung sein. Obwohl die Expressionslevel bei PcFK1, PcFK2 und der oktameren SM1-Peptid-Variante nicht unbedingt als niedrig zu bewerten sind, könnte dennoch überprüft werden, ob auch hier eine Anpassung des *codon usage* nötig wäre und dadurch eine noch bessere Akkumulationsrate erreicht werden könnte. Dies könnte zusammen mit der Modifikation der Reinigungsbedingungen zu einer sehr guten Ausbeute an rekombinantem Protein führen.

Je nach Infiltrationsereignis konnten aus 10 g gemörsertem Blattmaterial etwa zwischen 1 und 6 mg rekombinantes Protein gewonnen werden (Tab. 4.2). Die erreichten Akkumulationsraten deckten sich mit denen, die mit anderen rekombinanten Proteinen unter Verwendung desselben Systems (magnICON®, pICH15879) erreicht werden konnten (Hennig *et al.*, 2008; Pasquevich *et al.*, 2010; Webster *et al.*, 2009). Hier wurde die Akkumulationsrate des *Outer Surface Protein A* (OspA) von *Borrelia burgdorferi* auf zwischen 150 und etwa 450 µg pro 10 g Blattmaterial bestimmt (Hennig *et al.*, 2008). Pasquevich *et al.* konnten bis zu 200 µg einer Variante des *Outer Membrane Protein* (Omp)16 von *Brucella abortus* aus 10 g *N. benthamiana*-Blattmaterial reinigen (Pasquevich *et al.*, 2010). Dagegen beschrieben Webster *et al.* für ihre Kodon-optimierte Variante des *P. yoelii* MSP4/5 eine Akkumulationsrate von mindestens 10 mg pro 10 g Blattmaterial (FG), wobei hier ein unterschiedliches Integrase-Modul (pICH14011) verwendet wurde (Webster *et al.*, 2009).

Tabelle 4.2: Übersicht der infiltrierten Konstrukte und verwendeten *ICON*-Module mit Angabe der maximal isolierten Menge an rekombinantem Protein (in mg) aus 10 g gemörsertem Blattmaterial unter Verwendung des 5'-Moduls pICH15879.

3'-Module	Vektor (3'-Modul)	Koinfiltration mit 5'-Modulen	max. isol. Menge [mg]
<b>GFP:MCoTI-II-6121</b>	pICH10990	pICH15879/-17620	6.3
<b>GFP:MCoTI-II-SM1-6121</b>	pICH10990	pICH15879/-17620	4.6
<b>GFP:AGRP-SM1-6121</b>	pICH10990	pICH15879/-17620	6.8
<b>MCOTI001-6121</b>	pICH10990	pICH15879/-17620	4.7
<b>MCOTI002-6121</b>	pICH10990	pICH15879/-17620	5.2
<b>[SM1]<sub>8</sub>-6321</b>	pICH11599	pICH15879	1.0
<b>GFP:PcFK1-6121</b>	pICH10990	pICH15879/-17620	1.9
<b>GFP:PcFK2-6121</b>	pICH10990	pICH15879/-17620	1.9

#### 4.1.1.2 Bakterielle Expression der Varianten als alternatives Produktionssystem

Für die bakterielle Expression der Proteine wurden die entsprechenden Varianten unter Verwendung des bakteriellen Expressionsvektors pET-32a(+) kloniert und in *E. coli* Origami(DE3) transformiert. Die Vektoren des pET-Systems (Novagen) enthalten einen Promoter des Bakteriophagen T7, an den die T7-RNA-Polymerase sehr spezifisch bindet (Studier & Moffatt, 1986).

*E. coli* Origami(DE3) besitzen Mutationen im Thioredoxin-Reduktase- (*trxB*) und Glutathion-Reduktase-Gen (*gor*), wodurch die Ausbildung von Disulfidbrücken im *E. coli*-Cytoplasma deutlich erhöht werden kann (Bessette *et al.*, 1999; Prinz *et al.*, 1997). Dies wirkt sich günstig auf die Aktivität des exprimierten Proteins aus und führt in der Regel zu höheren Ausbeuten an aktivem Protein. Bei vielen Proteinen, die in *E. coli* eigentlich nur in unlöslicher Form produziert werden können, kann die Löslichkeit durch eine N-terminale Fusion mit Thioredoxin erhöht werden (LaVallie *et al.*, 1993). Das Thioredoxin-Fusionstag durch die Expression unter Verwendung des pET-32-Vektors kann aber nicht nur die Löslichkeit vieler Zielproteine erhöhen, sondern auch die Ausbildung von Disulfidbrücken im Cytoplasma von *trxB*-Mutanten katalysieren (Stewart *et al.*, 1998). Da der pET-32-Vektor kompatibel mit *trxB/gor*-mutierten *E. coli*-Stämmen (z. B. Origami<sup>TM</sup>), die selbst die Ausbildung von Disulfidbrücken im bakteriellen Cytoplasma begünstigen, ist, kann davon ausgegangen werden, dass diese Kombination große Mengen an löslichem, korrekt gefaltetem und aktivem Zielprotein liefert.

Die Expression der Zielproteine erfolgte hier also als Fusion mit Thioredoxin, wodurch die Ausbildung der für die Aktivität der Peptide essentiellen Disulfidbrücken im reduzierenden Milieu des bakteriellen Cytoplasma begünstigt werden sollte. Zur Reinigung der Proteine wurden Zellen in LB-Medium inokuliert, kultiviert und mit IPTG die Proteinexpression induziert, wobei im Vorfeld der Reinigung sowohl die Proteinakkumulation als auch die Bildung unlöslicher Proteinaggregate, sogenannter *inclusion bodies*, mittels SDS-PAGE überprüft wurden. *Inclusion bodies* werden häufig bei der Überexpression rekombinanter Proteine, besonders bei starker Expression, gebildet und bestehen aus den zumeist fehlerhaft oder unvollständig gefalteten Zielproteinen, die im Cytosol oder Periplasma der Bakterienzelle ausfallen. Die Bildung von *inclusion bodies* kann durch eine Senkung der Expressionsrate z. B. durch Verringerung der IPTG-Konzentration oder der Inkubationstemperatur, durch die Fusion des Zielproteins mit gut löslichen Proteinen wie der Glutathion-S-Transferase (GST) oder Thioredoxin, oder durch Unterstützung der korrekten Faltung des Zielproteins durch die Koexpression von Chaperonen verhindert bzw. reduziert werden. Neben der Modifikation der Expressionsbedingungen kann das Protein alternativ unter Verwendung denaturierender Agenzien aus den *inclusion bodies* gelöst, gereinigt und anschließend *in vitro* renaturiert werden.

Hier zeigte wiederum die oktamere Variante des SM1-Peptids nicht nur die niedrigste Akkumulationsrate, sondern gleichzeitig auch den größten Anteil an unlöslichem Protein, welches bei der Aufarbeitung der Kulturen mit dem Zellpellet abgetrennt wurde. Dadurch wurde die mögliche Ausbeute an rekombinantem Protein erheblich beeinträchtigt. Obwohl die niedrige

Proteinakkumulationsrate dabei jedoch gegen die Bildung von *inclusion bodies* spricht, da gerade eine hohe Konzentration des Zielproteins die Aggregationswahrscheinlichkeit erhöht, wird dennoch eine Fehlfaltung des rekombinanten Proteins vermutet, die einerseits zum Abbau des gebildeten Proteins, andererseits zur Bildung von Aggregaten und damit zu unlöslichen Produkten führte. Der hydrophile und gut lösliche Fusionspartner Thioredoxin scheint hier jedenfalls kaum einen positiven Einfluss auf die Löslichkeit des rekombinanten Proteins zu besitzen. Die Zugabe von 6 mM des zwitterionischen Detergens CHAPS zum Extraktionspuffer, welches zur Solubilisierung membrangebundener bzw. hydrophober Bereiche beitragen sollte, brachte ebenfalls keine Verbesserung der Löslichkeit. Allerdings wurde hier mit einer CHAPS-Konzentration von 6 mM im unteren Bereich der kritischen Mizellar-Konzentration (CMC; für CHAPS ca. 6 bis 10 mM) gearbeitet, um den nachfolgenden Proteinreinigungsprozess nicht zu beeinträchtigen.

Neben der vermuteten Fehlfaltung eines großen Anteils des rekombinanten Proteins erschwerte aber vor allem die niedrige Proteinakkumulationsrate die Produktion der oktameren SM1-Peptid-Variante. Niedrige Proteinausbeuten sind oftmals die Folge proteolytischen Abbaus während der Kultivierung bzw. der Reinigung. Dieser lässt sich einerseits durch die Verwendung Protease-defizienter Stämme wie *E. coli* BL21 (*lon<sup>-</sup>*, *ompT*) vermeiden, andererseits vermindern niedrige Temperaturen während der Inkubationszeit und der Reinigung sowie der Zusatz von Protease-Inhibitoren wie AEBSF oder PMSF zum Lysispuffer die Proteolyse. Dabei lieferte hier jedoch keine der zuletzt genannten Optionen ein besseres Ergebnis. Auch durch Variation der Expressionstemperatur (20 bis 37°C) konnte keine signifikante Steigerung der Akkumulationsrate bzw. Ausbeute an löslichem Protein erreicht werden. Daher erscheint auch eine mangelhafte Plasmidstabilität als Ursache für die niedrige Proteinmenge wahrscheinlich. Beim Gebrauch von Ampicillin als Selektionsmarker ist zu beachten, dass beträchtliche Mengen  $\beta$ -Lactamase produziert und ins Medium abgegeben werden. Dabei kann das zugegebene Ampicillin vollständig zerstört werden. Darüber hinaus ist Ampicillin gerade unter sauren Bedingungen, wie sie auch durch den bakteriellen Metabolismus entstehen, hydrolyseempfindlich. Daher können Zellen, die kein Plasmid tragen, die Kultur überwachsen, sobald eine gewisse Zelldichte erreicht und genügend  $\beta$ -Lactamase ins Medium abgegeben wurde. In der Folge kann nur eine geringe Proteinakkumulation detektiert werden. Die Verwendung eines stabileren Selektionsmarkers wie Carbenicillin anstelle von Ampicillin und die damit verbundene Erhöhung des Selektionsdruckes sollte jedoch ein Überwachsen der Kultur durch plasmidfreie Zellen verhindern. Eine weitere Alternative stellen pET-Vektoren dar, die anstelle des *bla*-Gens ein Kanamycin-Resistenzgen tragen (z. B. pET-28a). In weiteren Untersuchungen könnte darüber hinaus geklärt werden, ob sich eine Anpassung der Kodon-Auswahl oder die Verwendung eines *E. coli*-Stammes, der für seltene tRNAs kodiert (z. B. Rosetta<sup>TM</sup>), günstig auf die Akkumulationsrate auswirkt.

Die Reinigung der Proteine erfolgte mittels IMAC unter Verwendung des *Profinia*<sup>TM</sup> Protein Purification Systems von BioRad, wobei die erhaltene Proteinlösung entsalzt wurde. Der Erfolg

der Reinigung konnte durch Anfärben mit Coomassie bzw. Immunodetektion der gereinigten Proteine unter Verwendung eines Anti-His-Antikörpers bestätigt werden.

Die Ausbeute von durchschnittlich ca. 6 mg rekombinantem Protein pro 300 ml Kultur wurde als zufriedenstellend betrachtet, wobei eine maximale isolierte Proteinmenge von umgerechnet etwa 20 bis 30 mg/l Bakterienkultur erreicht werden konnte (Tab. 4.3). Die affinitätsgereinigten und entsalzten Proteinlösungen konnten jedoch noch leichte Verunreinigungen durch geringe Mengen unspezifisch gebundener bakterieller Proteine enthalten. Da neben der Bestimmung der Aktivität der gereinigten MCoTI-II-Varianten durch einen Trypsin-Inhibitionsassay vor allem aber das Verhalten bzw. die Wirkung der Proteine in Fütterungsexperimenten mit *Anopheles* untersucht werden sollte, wurde die Reinheit der erhaltenen Proteinlösungen hinsichtlich der geplanten Applikationen als ausreichend angesehen und nicht weiter optimiert.

Weiterhin wurde von einer Abspaltung des Fusionspartners Thioredoxin abgesehen, da dies zuvor zum vollständigen Verlust des rekombinanten Proteins geführt hatte (Tan Thanh Huynh, 2009, Diplomarbeit). In sämtlichen nachfolgenden Anwendungen wurden daher jeweils die Fusionsproteine eingesetzt. Durch die Messung der Aktivität des rekombinanten MCoTI-II konnte dabei jedoch untersucht werden, ob das aktive Zentrum des Zielproteins in der Fusion mit Thioredoxin zugänglich ist.

Tabelle 4.3: Übersicht der bakteriell exprimierten Varianten mit Angabe der maximal isolierten Proteinmenge.

Konstrukt	Expressionssystem	max. isol. Menge an rekomb. Protein
TRX:MCoTI-II	pET-32a(+)/ <i>E. coli</i> Origami(DE3)	20.5 mg/l
TRX:MCoTI-II-SM1	pET-32a(+)/ <i>E. coli</i> Origami(DE3)	31.5 mg/l
TRX:AGRP-SM1	pET-32a(+)/ <i>E. coli</i> Origami(DE3)	22.3 mg/l
TRX: [SM1] <sub>8</sub>	pET-32a(+)/ <i>E. coli</i> Origami(DE3)	6 mg/l
TRX:PcFK1	pET-32a(+)/ <i>E. coli</i> Origami(DE3)	23 mg/l
TRX:PcFK2	pET-32a(+)/ <i>E. coli</i> Origami(DE3)	20.3 mg/l

#### 4.1.1.3 Nachweis der Aktivität der MCoTI-II-Varianten als Indikator für die Funktionalität der erzeugten Proteine

Als Inhibitor der Protease Trypsin kann das rekombinante MCoTI-II zum Nachweis seiner korrekten Faltung und damit der Funktionalität des jeweils verwendeten Expressionssystems einem Trypsin-Inhibitionsassay unterzogen werden. Zur Bestimmung der Aktivität der rekombinanten MCoTI-II-Varianten wurde daher eine definierte Menge Trypsin jeweils mit verschiedenen Konzentrationen der zu untersuchenden, gereinigten Variante inkubiert und



anschließend zur Messung der verbliebenen Aktivität mit dem synthetischen chromogenen Substrat N-Benzoyl-D,L-arginin-p-nitroanilid (BAPNA) versetzt. Die Freisetzung von p-Nitroanilin aus BAPNA durch Trypsin wurde durch die Messung des Anstiegs der Absorption bei 405 nm als Maß für die Enzymaktivität beziehungsweise die inhibitorische Wirksamkeit des rekombinanten Peptids direkt verfolgt. So konnte die Enzym-Inhibitor-Interaktion durch Messung der Enzymaktivität in Abhängigkeit von der InhibitorKonzentration untersucht werden. Die Darstellung der Änderung der Absorption bei 405 nm pro Minute ( $\Delta A_{405}/\text{min}$ ) in einem Diagramm gegen die Konzentration des getesteten Peptids ermöglichte den direkten Vergleich der inhibitorischen Wirksamkeit der verschiedenen Varianten.

Dabei wies die transient in *Nicotiana benthamiana* exprimierte MCoTI-II-Variante MCOTI001 konzentrationsabhängig sowohl bei cytosolischer als auch bei apoplastischer Expression eine Inhibition der Trypsinaktivität auf. Die beiden Zellkompartimente waren hier besonders hinsichtlich ihres Einflusses auf die Ausbildung von Disulfidbrücken und somit auf die Faltung und Aktivität der akkumulierten Proteine interessant. Dabei war davon auszugehen, dass die Variante des sekretorischen Weges, die also in Kombination mit dem 5'-Pro-Vektor-Modul mit Apoplast-Targetingsequenz infiltriert worden war, durch die Begünstigung der Möglichkeit der Ausbildung von Disulfidbrücken eher eine korrekte Faltung und damit eine höhere Aktivität aufweist, als die im Cytosol akkumulierte. Das Verhalten von MCOTI001 hinsichtlich seiner trypsininhibitorischen Aktivität deutete in einer ersten Messung jedoch darauf hin, dass hier auch bei Akkumulation im Cytosol eine biologisch aktive Protein-Konformation entstehen kann.

Zur Analyse der Reproduzierbarkeit wurden die Messungen mit Blattmaterial dreier verschiedener Infiltrationsereignisse wiederholt, wobei auch der Einfluss der Lagerung auf die gereinigte Probe berücksichtigt wurde. Dazu wurden die Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten mit Inhibitorlösungen unterschiedlichen Alters durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Messungen scheinen zu belegen, dass unterschiedliche Infiltrationsereignisse unabhängig von der Akkumulationsrate und der Dauer der Lagerung der gereinigten Proteinlösung unterschiedlich aktives Protein liefern können. So ergab ein erstes Infiltrationsereignis keinen signifikanten Aktivitätsunterschied zwischen den in den unterschiedlichen Zellkompartimenten akkumulierten Varianten. Ein zweites und drittes Infiltrationsereignis ergaben dagegen genau entgegengesetzte Ergebnisse: Hier lieferte einmal die Akkumulation im Apoplasten, einmal die Akkumulation im Cytosol das aktivere Protein. Eine mögliche Erklärung für diesen Sachverhalt kann einerseits in der Verwendung unterschiedlichen Pflanzenmaterials für die einzelnen Infiltrationsereignisse vermutet werden. Andererseits erscheint es wahrscheinlich, dass die nicht sehr hohe Reinheit der Proteinlösungen, deren Konzentration mittels BCA-Assay bestimmt worden war, sich hier auf das Ergebnis auswirkte. Enthält die vermessene Probe eine Verunreinigung durch andere Proteine, z. B. RuBisCo, so werden diese bei der Konzentrationsbestimmung mittels BCA-Assay mit erfasst und in der Folge ein höherer Wert für die Konzentration des gereinigten rekombinanten Proteins ermittelt. Hier könnte also der Grad der Verunreinigung der jeweils untersuchten Proteinlösung das Ergebnis der Messung, welches in Abhängigkeit von der Inhibitor-Konzentration bestimmt

wurde, beeinflusst haben. Eine quantitative Bestimmung des rekombinanten Proteins mittels ELISA könnte daher genauere Ergebnisse liefern.

Unabhängig von der Ursache für die inhomogenen Ergebnisse konnte aber gezeigt werden, dass in jedem Fall – nicht nur durch die Expression im Apoplasten, sondern auch durch die Akkumulation im Cytosol – biologisch aktives Protein gewonnen werden konnte.

Die als GFP-Fusion exprimierte Variante von MCoTI-II, GFP:MCoTI-II, zeigte keine inhibitorische Wirksamkeit. Eine fehlende Aktivität ist hier vermutlich jedoch auf den nur sehr geringen Anteil des Inhibitors an der Gesamtproteinmasse zurückzuführen. Da der verhältnismäßig große Fusionspartner GFP hier maßgeblich die Masse bestimmt, müsste eine weitaus größere Menge Protein für die Messungen der inhibitorischen Aktivität des Fusionsproteins eingesetzt werden. Da nur eine begrenzte Menge des Fusionsproteins aufgereinigt werden konnte, wurden keine weiteren Messungen durchgeführt.

Die bakteriell in *E. coli* Origami(DE3) exprimierte Variante des MCoTI-II, bei welcher es sich um ein Fusionsprotein von MCoTI-II mit Thioredoxin handelte, zeigte eine inhibitorische Aktivität gegenüber Trypsin, die in zwei voneinander unabhängigen Experimenten nachgewiesen werden konnte. Wie zuvor beschrieben eignet sich das bakterielle Cytoplasma nur bedingt zur Akkumulation rekombinanter Proteine, die die Ausbildung von Disulfidbrücken für eine korrekte Faltung benötigen. Im reduzierenden Milieu des Cytoplasma ist die Ausbildung von Disulfidbrücken eigentlich nicht möglich. Daher müssen die entsprechenden Proteine entweder ins stärker oxidierende Milieu des Periplasma transloziert oder das Expressionssystem muss dementsprechend ausgerichtet werden. Hier konnte gezeigt werden, dass durch die Wahl eines *trxB/gor*-mutierten *E. coli*-Stammes in Kombination mit dem Vektor pET-32a lösliches, aktives und somit korrekt gefaltetes Zielprotein gewonnen werden konnte.

Verglichen mit der pflanzlich im Cytosol bzw. Apoplasten exprimierten Variante zeigte das bakterielle Peptid eine ähnliche trypsininhibitorische Aktivität. Ein direkter Vergleich der inhibitorischen Aktivität von pflanzlich und bakteriell exprimierter Variante ist jedoch nur bedingt möglich, da die Masse des bakteriell gewonnenen Proteins wesentlich durch den Fusionspartner Thioredoxin bestimmt wird. Bei etwa gleichen Konzentrationsverhältnissen ist für die aus *E. coli* gereinigte Variante also eine niedrigere trypsininhibitorische Aktivität zu erwarten. Um direkt vergleichbare Messergebnisse zu erhalten, müssten im Vorfeld der Messung der Fusionspartner Thioredoxin abgespalten und schließlich die Konzentration an rekombinantem Protein ermittelt werden.

Die hier gewonnenen Ergebnisse sind jedoch ausreichend, um die Aktivität der produzierten Varianten des CKM MCoTI-II zu belegen. Daher bildeten sie die Grundlage für die nachfolgenden Untersuchungen, da durch den Nachweis der trypsininhibitorischen Aktivität und somit der Funktionalität Rückschlüsse auf die korrekte Faltung zu biologisch aktivem Protein gezogen werden konnten. Darüber hinaus konnte anhand des Thioredoxin-Fusionsproteins gezeigt werden, dass zumindest für die *Anopheles*-Fütterungsexperimente keine Notwendigkeit besteht,

das Fusionsprotein nach der Expression und Reinigung abzuspalten, um natives Protein zu erhalten. Die Untersuchungen zur Trypsininhibition belegen durch den Nachweis der Funktionalität, dass die Inhibitorschleife des Zielproteins zugänglich ist und nicht durch den Fusionspartner Thioredoxin in ihrer Bindungsfähigkeit gestört wird. Dies impliziert, dass vermutlich auch bei TRX:MCoTI-II-SM1 das hier integrierte SM1-Peptid zugänglich ist, durch das Fusionsprotein also bezüglich seiner *Plasmodium*-inhibitorischen Wirksamkeit nicht ungünstig beeinflusst wird und daher auch in dieser Form für die Fütterungsversuche verwendet werden kann.

Eine genauere Aufklärung sowohl der Faltung als auch der Masse der in den beiden verschiedenen Systemen produzierten Proteine könnten massenspektrometrische Untersuchungen liefern. Dadurch wären weitere Aussagen möglich, wie sich das pflanzliche Expressionssystem hinsichtlich der Produktion korrekt gefalteten und biologisch aktiven Proteins vom bakteriellen System unterscheidet und wo hier der Anteil korrekt gefalteten Proteins in Abhängigkeit vom subzellulären Targeting dominiert.

Zusammenfassend lieferte der Nachweis der trypsininhibitorischen Aktivität also die Bestätigung, dass durch das verwendete pflanzliche - aber auch durch das bakterielle - Expressionssystem biologisch aktives Protein gewonnen werden konnte.

In der vorliegenden Arbeit konnte damit am Beispiel des CKM MCoTI-II aus *Momordica cochinchinensis* zum ersten Mal die rekombinante Produktion funktioneller Cystin-Knoten-Mikroproteine in Pflanzen gezeigt werden, wobei etwa 0.5 mg pro Gramm Blattmaterial isoliert werden konnten. Cystin-Knoten-Proteine besitzen eine außerordentliche Stabilität, verschiedenste biologische Aktivitäten sowie eine hohe Affinität und Selektivität, was sie für pharmazeutische Anwendungen äußerst interessant macht (Kap. 1.4.4.1; Gruber *et al.*, 2007). Da sie darüber hinaus eine bemerkenswerte Sequenztoleranz aufweisen, sind sie ideal zur Verwendung als molekulare Grundgerüste zur Integration neuer Funktionen und damit zur Generierung neuer Wirkmoleküle für den Einsatz in Therapie und Diagnostik (Craig *et al.*, 2012; Daly & Craig, 2011; Kolmar, 2009, 2011). Die in dieser Arbeit beschriebene Produktion von MCoTI-II in *N. benthamiana* und der Nachweis der Funktionalität zeigen, dass das pflanzliche Expressionssystem eine geeignete Alternative zur Produktion dieser vielversprechenden Biomoleküle bietet.

#### **4.1.2 Produktion der *Plasmodium* TRAP-A-Domäne, von P25 und P28 sowie *Anopheles* Saglin**

Nachdem Brennan *et al.* im Jahr 2000 mit einem monoklonalen Antikörper gegen ein 100 kDa großes Speicheldrüsen-Protein von *Anopheles gambiae* die Invasion der Sporozoiten von *P. yoelii* in die Speicheldrüse effektiv inhibieren (Brennan *et al.*, 2000) und Okulate *et al.* etwas später zeigen konnten, dass dieser monoklonale Antikörper das glycosylierte homodimere Protein

Saglin erkennt (Okulate *et al.*, 2007), gelang es Ghosh *et al.* einen Zusammenhang zwischen dem synthetischen Dodecapeptid SM1, dem *thrombospondin-related anonymous protein* (TRAP) sowie dem Speicheldrüsenprotein Saglin aufzudecken (Ghosh *et al.*, 2009).

Das von den Sporozoiten exprimierte TRAP ist in allen *Plasmodium*-Arten konserviert (Robson *et al.*, 1988) und dabei essentiell für die Gleitbewegung der Sporozoiten, für die Zellinvasion sowie für die Infektiosität *in vivo* (Sultan *et al.*, 2001; Sultan *et al.*, 1997). Der extrazelluläre Teil des TRAP besitzt zwei konservierte adhäsive Domänen, darunter die von Willebrand Faktor A-Domäne, kurz „A-Domäne“ (Girma *et al.*, 1987; Whittaker & Hynes, 2002), welche ein konserviertes Motiv (MIDAS, *metal ion-dependent adhesion site*) enthält, das die Liganden-Bindung vermittelt und damit essentiell für die Invasion der Sporozoiten in die Speicheldrüse ist (Lee *et al.*, 1995; Michishita *et al.*, 1993). Untersuchungen deuten darauf hin, dass die A-Domäne an der Erkennung bzw. Bindung von Rezeptormolekülen der Speicheldrüse beteiligt ist (Wengelnik *et al.*, 1999; Matuschewski *et al.*, 2002).

Das zuvor beschriebene SM1-Peptid ist in diesem Zusammenhang das konformationelle Mimotop der *Plasmodium* TRAP-A-Domäne, wobei das Speicheldrüsenprotein Saglin als der Rezeptor sowohl für das SM1-Peptid als auch für die A-Domäne des TRAP identifiziert wurde (Ghosh *et al.*, 2009). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die A-Domäne des TRAP mit dem SM1-Peptid konzentrationsabhängig um die Bindung an Saglin konkurriert (Ghosh *et al.*, 2009). Untersuchungen mit einem anti-Saglin-Antikörper, die eine starke Inhibition der Speicheldrüseninvasion durch Sporozoiten von *P. falciparum* und *P. berghei* ergaben, deuten darauf hin, dass beide Parasiten das Protein Saglin für die Invasion der Speicheldrüse nutzen (Ghosh *et al.*, 2009). Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass sowohl die A-Domäne als auch Saglin eine wichtige Rolle bei der Invasion der Speicheldrüse spielen (Ghosh *et al.*, 2009) und ihre Inhibition einen wichtigen Beitrag zur Senkung der Übertragung der Malaria leisten kann. Aber auch andere Proteine, wie die der frühen Sexualstadien, sind als potentielle Kandidaten für die Entwicklung transmissionsblockierender Vakzine (TBV) von hohem wissenschaftlichem Interesse (Pradel, 2007). Dazu gehören auch P25 und P28, die innerhalb der Gattung *Plasmodium* hochkonserviert sind und die Plasmamembran der Ookineten dominieren (Duffy & Kaslow, 1997; Duffy *et al.*, 1993; Kaslow *et al.*, 1988; Kaslow *et al.*, 1989; Kumar & Carter, 1985; Paton *et al.*, 1993; Tsuboi *et al.*, 1997a; Tsuboi *et al.*, 1997b; Tsuboi *et al.*, 1998; Vermeulen *et al.*, 1985). Untersuchungen ergaben, dass die beiden Proteine eine für *Plasmodium* essentielle Funktion in Bezug auf das Überleben im Mitteldarm des Moskito, die Penetration des Mitteldarmepithels sowie auf die Reifung zu Oocysten besitzen (Siden-Kiamos & Louis, 2004; Siden-Kiamos *et al.*, 2000).

P25 und P28 besitzen beide mehrere Cystein-Reste und eine komplexe Tertiärstruktur. Obwohl dies die Produktion in heterologen Expressionssystemen erschwert, konnten mit verschiedenen Varianten bereits diverse Erfolge erzielt werden (Hisaeda *et al.*, 2000; Barr *et al.*, 1991; Kaslow *et al.*, 1994; Rawlings & Kaslow, 1992; Kubler-Kielb *et al.*, 2007; Qian *et al.*, 2007; Saxena *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2006).

In der vorliegenden Arbeit sollten die A-Domäne des TRAP, P25 und P28 als plasmodiale Antigene sowie Saglin als Zielstruktur in *Anopheles* heterolog im bakteriellen Expressionssystem bzw. transient in *Nicotiana benthamiana* produziert werden. Dies sollte die Grundlage für zukünftige Arbeiten, wie die Identifikation bindender und damit inhibitorischer Strukturen unter Verwendung einer Phagenbibliothek, bilden. Diese bindenden Proteine könnten wiederum als antiplasmodiale Antikörperfragmente in Pflanzen exprimiert werden und dazu beitragen, die Transmission von *Plasmodium* vom Mosquito auf den Menschen zu blockieren. Darüber hinaus sollte ihre Wirksamkeit als sogenannte kompetitive Antagonisten in Fütterungsexperimenten mit *Anopheles* hinsichtlich ihrer *Plasmodium*-inhibitorischen Wirksamkeit untersucht werden.

#### 4.1.2.1 Transiente Expression plasmodialer Antigene

Da im Falle des Saglin keine entsprechenden *A. tumefaciens* GV3101 erhalten werden konnten und bei P25 und P28 dieser Ansatz im Rahmen dieser Arbeit nicht berücksichtigt werden konnte, erfolgte analog zu den unter 4.1.1 beschriebenen Varianten in diesem Teil der Arbeit lediglich die transiente pflanzliche Expression der A-Domäne des *P. berghei* TRAP.

Nach der Klonierung unter Verwendung des 3'-Pro-Vektor-Moduls pICH11599 und Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* sollte unter Verwendung der 5'-Pro-Vektor-Module pICH15879 und pICH17620 eine Akkumulation des Zielproteins im Cytosol bzw. Apoplasten von *N. benthamiana* erreicht werden.

Auch hier zeigten die Pflanzen nach der Infiltration eine ganz unterschiedliche Vitalität, weshalb es hier ebenfalls erforderlich war, wiederholt zu infiltrieren. Im mit Coomassie gefärbten Gel des Gesamtproteinextraktes konnte das Zielprotein im Vergleich mit dem Proteinbandenmuster des *N. benthamiana*-Wildtyps als zusätzliche Bande nicht sichtbar gemacht und daher die Proteinakkumulation als gering eingestuft werden. Dennoch konnte im untersuchten Blattmaterial mittels Immunoblot eine niedrige Proteinakkumulation sowohl im Cytosol als auch im Apoplasten nachgewiesen werden, wobei die Akkumulation im Apoplasten insgesamt eine etwas höhere Menge an rekombinantem Protein zeigte.

Die Affinitätsreinigung der rekombinanten A-Domäne führte jedoch nicht zu einer Anreicherung des Proteins und in weiteren Untersuchungen müsste daher zunächst eine Optimierung des Expressionssystems erfolgen. Die Produktion plasmodialer Antigene in Pflanzen ist heute ein vielversprechender Ansatz (Ma *et al.*, 2012). Ma *et al.* konnten beispielsweise unter Verwendung des gleichen viralen Systems bei Akkumulation im Apoplasten und unter Verwendung einer Kodon-optimierten Sequenz eine Akkumulationsrate des 19-kDa großen C-terminalen Fragmentes des *Plasmodium yoelii* merozoite surface protein-1 (PyMSP1<sub>19</sub>) von über 23 % des LGP beschreiben (Ma *et al.*, 2012). Dies stellt eine deutliche Verbesserung im Vergleich zu stabilen Transformationsmethoden hinsichtlich der Ausbeute dar und ist darüber hinaus - plasmodiale Antigene betreffend - auch die höchste bisher publizierte Menge (Ma *et al.*, 2012). Das 19-kDa große C-terminale Fragment des *P. falciparum* MSP1 (PfMSP1<sub>19</sub>) war das erste stabil in Pflanzen exprimierte plasmodiale Antigen mit einer Akkumulationsrate von nur etwa 0.0035 % des LGP (Ghosh *et al.* 2002). Später konnten für PyMSP4/5 immerhin 0.25 % des LGP

bei stabiler Transformation von Tabak erreicht werden, wobei hier die Sequenz an den *codon usage* von Pflanzen angepasst wurde (Wang *et al.*, 2008).

Die maximal dokumentierte Menge eines plasmodialen Antigens, welches stabil im Kern exprimiert wurde, wurde für das Kodon-optimierte, in den Samen von *Arabidopsis thaliana* produzierte 42 kDa große C-terminale Fragment des *PMSP1* (*PMSP1<sub>42</sub>*) beschrieben. Hier erreichten Lau *et al.* eine Menge von bis zu 5 % des Gesamtproteins, wobei dieses Beispiel deutlich macht, welchen Einfluss eine Optimierung der Sequenz und die Lokalisation auf die Proteinakkumulation haben können (Lau *et al.* 2010). Aber auch durch die stabile Expression von Transgenen in den Chloroplasten verschiedener Pflanzenarten konnten große Mengen rekombinanten Proteins gewonnen werden. So konnten für das *P. falciparum apical membrane antigen-1* (*PfAMA1*) und *PMSP1* in transplastomen Salatpflanzen (*Lactuca sativa*) Akkumulationsraten von 7.3 bzw. 6.1 % des LGP erreicht werden (Davoodi-Semiromi *et al.*, 2010).

Diese Beispiele zeigen, dass einerseits das virale Pro-Vektor-System, andererseits die Anpassung des *codon usage* die Akkumulationsrate von in Pflanzen produzierten Antigenen von *Plasmodium* deutlich verbessern können (Webster *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2012). Hier können seltene Kodons, AU-reiche destabilisierende Sequenzen sowie Polyadenylierungs- und Splicing-Signale zu einem schnellen Abbau der mRNA führen und so die Expression der Fremdgene limitieren (Clemente & Corigliano, 2012), da das Parasitengenom über einen ungewöhnlich hohen AT-Gehalt verfügt. Tatsächlich konnte durch die Kombination von Kodon-Optimierung und dem viralen System von *ICON-Genetics* im Vergleich zur stabilen Transformation eine Steigerung der Ausbeute plasmodialer Antigene bis um das 100-fache erreicht werden (Wang *et al.*, 2008; Webster *et al.*, 2009; Clemente & Corigliano, 2012).

In weiterführenden Arbeiten müsste daher geprüft werden, ob eine synthetische Sequenz der A-Domäne, die an die Kodon-Auswahl von Tabak angepasst wurde, eine höhere Akkumulationsrate liefert. Weiterhin müsste evaluiert werden, inwiefern Modifikationen des Reinigungsprotokolls, z. B. durch den Zusatz eines Detergens zum Extraktionspuffer oder durch denaturierende Bedingungen, zu einer Verbesserung der Proteinausbeute führen können.

Darüber hinaus könnten weitere Anstrengungen unternommen werden, die übrigen Proteine transient in *N. benthamiana* zu exprimieren, um das pflanzliche Expressionssystem als Alternative zur bakteriellen Expression insbesondere hinsichtlich Akkumulationsrate und Faltung der rekombinanten Proteine zu beurteilen.

#### **4.1.2.2 Bakterielle Expression der plasmodialen Antigene und des *Anopheles* Saglin**

Für die bakterielle Expression der Proteine in *E. coli* Origami bzw. *E. coli* BL21 wurden die kodierenden Sequenzen jeweils in die bakteriellen Expressionsvektoren pET-32a(+) und pET-28a(+) kloniert, so dass die Expression sowohl als Thioredoxin-Fusion als auch ohne Fusionspartner erfolgen konnte. Das Expressionssystem unter Verwendung von *E. coli* Origami(DE3) wurde zuvor bereits beschrieben und diskutiert (Kap. 4.1.1.2). Mit *E. coli* BL21(DE3) stand darüber hinaus ein Protease-defizienter Stamm (*lon<sup>-</sup>*, *ompT*) zur Verfügung,

wodurch ein proteolytischer Abbau des rekombinanten Proteins vermindert und somit die Ausbeute erhöht werden kann (vergleiche Kap. 4.1.1.2). Tabelle 4.4 liefert noch einmal einen Überblick der hier verwendeten Konstrukte.

Die elektrophoretische Untersuchung der Proteinakkumulation ergab für die A-Domäne und Saglin nach Färbung mit Coomassie eine zwar eher niedrige aber doch als zusätzliche Bande im Gesamtproteinextrakt detektierbare Menge. Die Akkumulation von Pfs25 bzw. Pfs28 konnte im *E. coli*-Gesamtproteinextrakt dagegen nur mittels Immunodetektion nachgewiesen (Daten nicht gezeigt) und daher als sehr gering bewertet werden. Für die TRAP-A-Domäne konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass sich die Expression als Thioredoxinfusion in *E. coli* Origami günstig auf die Löslichkeit des rekombinanten Proteins auswirkte und so weniger unlösliches Protein im Pellet gefunden wurde. Eine Reinigung der rekombinanten Proteine unter denaturierenden Bedingungen wurde aufgrund der Notwendigkeit der Rückfaltung zur nativen Konformation generell ausgeschlossen.

Die Reinigung der Proteine erfolgte mittels IMAC unter Verwendung des *Profinia™ Protein Purification Systems* von *BioRad*. Die Analyse der Eluatfraktionen zeigte für die A-Domäne, Pfs28 und Saglin neben den monomeren Formen außerdem das Vorliegen von Di- bzw. Oligomeren. Da die Bildung oligomerer Formen bei der A-Domäne und Pfs28 jedoch insbesondere bei der Expression in *E. coli* BL21-Zellen, die anders als *E. coli* Origami nicht über *trxB*- und *gor*-Mutationen verfügen, zu beobachten war, könnte hier eine Ursache die fehlerhafte oder unvollständige Ausbildung von Disulfidbrücken sein.

Insgesamt erschwerte hier vor allem die niedrige Proteinakkumulationsrate die Produktion der Proteine. Da die Menge an rekombinantem Protein weder durch niedrige Temperaturen während der Kultivierung oder Reinigung, noch durch eine Verkürzung der Inkubationszeit oder den Zusatz des Protease-Inhibitors AEBSF zum Lysispuffer gesteigert werden konnte, scheinen niedrige Proteinausbeuten hier aber nicht hauptsächlich die Folge proteolytischen Abbaus zu sein. Weiterhin konnte unter Verwendung des Protease-defizienten Stammes *E. coli* BL21 – insbesondere für Pfs25 und Pfs28 - zwar weniger abgebautes Protein detektiert, insgesamt jedoch keine Erhöhung der Akkumulationsrate erreicht werden. Dieses Ergebnis spricht daher auch gegen eine mangelhafte Plasmidstabilität als Ursache für die geringe Proteinausbeute (vgl. Kap. 4.1.1.2), da auch bei Selektion mit Kanamycin keine höhere Proteinakkumulation beobachtet werden konnte. In zukünftigen Untersuchungen könnte daher geprüft werden, ob sich durch eine Anpassung der Sequenzen an das *codon usage* von *E. coli* oder die Verwendung eines für seltene tRNAs kodierenden *E. coli*-Stammes eine Verbesserung der Ausbeute an rekombinantem Protein erreichen ließe.

Die erhaltenen Proteinlösungen wurden jedoch auch angesichts ihres eher geringen Gehalts an rekombinantem Protein für die weiteren Anwendungen verwendet, da einerseits für die Fütterungsexperimente mit *Anopheles stephensi* die Reinheit der eingesetzten Proteinlösung nicht im Vordergrund stand, andererseits zur nachfolgenden Generierung von Antikörperfragmenten eine sehr geringe Menge Protein ausreichend war.

Tabelle 4.4: Übersicht der bakteriell exprimierten Varianten unter Angabe des Expressionssystems und der maximal isolierten Menge an rekombinantem Protein.

Konstrukt	Expressionssystem	max. isol. Menge an rekomb. Protein
<b>TRX:PbTRAP-Ado</b>	pET-32a(+)/ <i>E. coli</i> Origami(DE3)	5 mg/l
<b>PbTRAP-Ado</b>	pET-28a(+)/ <i>E. coli</i> BL21(DE3)	8 mg/l
<b>TRX:Saglin_syn</b>	pET-32a(+)/ <i>E. coli</i> Origami(DE3)	7 mg/l
<b>Saglin_syn</b>	pET-28a(+)/ <i>E. coli</i> BL21(DE3)	14 mg/l
<b>TRX:Pfs25</b>	pET-32a(+)/ <i>E. coli</i> Origami(DE3)	12 mg/l
<b>Pfs25</b>	pET-28a(+)/ <i>E. coli</i> BL21(DE3)	14 mg/l
<b>TRX:Pfs28</b>	pET-32a(+)/ <i>E. coli</i> Origami(DE3)	2 mg/l
<b>Pfs28</b>	pET-28a(+)/ <i>E. coli</i> BL21(DE3)	7 mg/l

#### 4.1.3 Expression der potentiell *Plasmodium*-inhibitorischen Proteine im Phloem-Saft von *Ricinus communis*

*Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae) ist insbesondere wegen seiner Samen, die etwa 50 % fettes Öl enthalten, eine bedeutende Kulturpflanze, die vor allem in tropischen und subtropischen Ländern weit verbreitet ist (Weiss, 2000). Da die Samen der gängigen Varietäten von *Ricinus* das Toxin Ricin (Hartley & Lord, 2004; Lord *et al.*, 1994) und hyperallergene Proteine (2S-Albumine) enthalten (Pastorello *et al.*, 2001; Shewry *et al.*, 2002), kann die Kultivierung bzw. Verarbeitung von *Ricinus* mit großen gesundheitlichen Risiken verbunden sein. In der Vergangenheit wurden daher Anstrengungen unternommen, ein effizientes *in vitro*-Regenerationsprotokoll zu etablieren, um robustere und weniger toxische Sorten zu erhalten. Allerdings lässt *Ricinus* sich nur schwer *in vitro* regenerieren und genetisch transformieren (Severino *et al.*, 2012); daher ist es in den letzten 30 Jahren auch kaum gelungen, eine standardisierte, reproduzierbare Methode mit ausreichender Effizienz zu entwickeln (Sujatha & Sailaja, 2005), wodurch nach wie vor Bedarf an einem verbesserten Regenerations- und Transformationsprotokoll besteht (Sujatha *et al.*, 2008).

Trotz des als schwierig zu bezeichnenden Transformationsprozesses erschien *Ricinus communis* im Rahmen der vorliegenden Arbeit unter Beachtung der folgenden Aspekte als besonders geeignet für die Expression der entsprechenden Transgene im Phloem und damit als Applikationssystem der inhibitorischen Kandidatenproteine: i) *Ricinus communis* ist in vielen tropischen und subtropischen Ländern, in denen Malaria endemisch auftritt, weit verbreitet; ii) *R. communis* besitzt eine Vielzahl extra-floraler Nektarien, deren Nektar u. a. Moskitos (*Culex* spp.) als Nahrungsquelle dient (Taylor & Foster, 1996; Manda *et al.*, 2007), wobei auch *Anopheles gambiae* bei der Nahrungsaufnahme an *Ricinus* beobachtet werden konnte (Impoinvil *et al.*, 2004); iii) Untersuchungen mit *Arabidopsis thaliana* zeigten, dass GFP unter der Kontrolle des



*AtSUC2*-Promotors in die Siebelemente gelangt und zusammen mit den Assimilaten zu den Orten des Verbrauchs transportiert wird (Imlau *et al.*, 1999), weshalb ein Transport von im Phloemsaft von *Ricinus communis* akkumulierten Proteinen zu den Nektarien wahrscheinlich erscheint.

Letztere Annahme konnte durch die massenspektrometrische Analyse einer Nektarprobe bestätigt werden. Hier konnte das Protein Cyclophilin nachgewiesen werden (diese Arbeit), für welches zuvor das Vorhandensein im Phloemsaft von *Ricinus* beschrieben worden war (Barnes *et al.*, 2004; Gottschalk *et al.*, 2008). Eine Expression der inhibitorischen Kandidatenproteine im Phloem und deren nachfolgende Weiterleitung in den Nektar sollte also prinzipiell möglich sein. Auf diesem Wege könnten die entsprechenden Proteine schließlich den Moskitos verabreicht werden und mit Strukturen innerhalb der Stechmücke oder den entsprechenden Entwicklungsstadien von *Plasmodium* interagieren, um letztendlich dazu beizutragen, die Transmissionsrate des Parasiten auf den Menschen zu senken.

Neben der Produktion der potentiell *Plasmodium*-inhibitorischen Proteine SM1, PcFK1 und PcFK2 unter Verwendung des transienten Virus-Vektor basierten System von *ICON-Genetics* und des pET-Systems zur bakteriellen heterologen Expression mit der anschließenden Untersuchung der gereinigten Proteine in Fütterungsexperimenten an *Anopheles* sollten die Proteine also unter der Kontrolle des Phloem-spezifischen Promotors *AtSUC2* stabil in *Ricinus communis* exprimiert werden. Dabei sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob die Kandidatenproteine durch die Expression im Phloem auch im Nektar der Pflanze nachweisbar wären und sich dieser Ansatz somit als Applikationssystem antiplasmodial wirksamer Proteine eignen könnte.

Die Transformation von *Ricinus communis* nach dem Protokoll von US-Patent 6620986 (McKeon & Chen, 2003) unter Verwendung der weiblichen Blütenknospen lieferte keine positiven Resultate (Daten nicht gezeigt). Daher erfolgte die Transformation in Anlehnung an das Protokoll der meristem-basierten Transformationsmethode von Sujatha und Sailaja (Sujatha & Sailaja, 2005). Dabei war eine recht aufwendige Vorgehensweise und die Explantation einer sehr großen Anzahl von Embryonen erforderlich, da nach der Vorkultivierung nur wenige Exemplare (etwa 10 % aller Explantate) als Zeichen der fortschreitenden Proliferation eine geschwollene meristematische Region aufwiesen und überhaupt transformiert werden konnten. Die hier verwendete Transformationsmethode zeichnete sich außerdem durch eine sehr niedrige Regenerationsrate und ein frühes Absterben putativer Transformanten aus. Insbesondere konnte ein Überwachsen der Embryonen durch die zur Transformation verwendeten Agrobakterien beobachtet werden. Eine Verringerung der Zelldichte der zur Vakuuminfiltration eingesetzten Bakteriensuspension brachte jedoch - ebenso wie verstärktes Waschen mit Cefotaxim (250 mg/l) und Umsetzen auf frisches Nährmedium - keine Verbesserung. Dennoch konnten zwei GFP-exprimierende transformante Pflanzen generiert werden, wobei die GFP-Expression im Blattmaterial mittels Immunoblot nachgewiesen werden konnte. Da jedoch auch die beiden erzeugten Transformanten kurze Zeit nach der Immunoblot-Analyse abstarben, waren hier weitere Untersuchungen nicht möglich. Weitere putative Transformanten konnten aufgrund der geringen Transformationseffizienz (0.08 %, also 1 putative Transformante bei etwa 1200 Explantaten;

Sujatha & Sailaja, 2005) nicht generiert und daher hinsichtlich der Analyse der potentiell *Plasmodium*-inhibitorischen Proteine im Rahmen dieser Arbeit keine weiteren Ergebnisse erzielt werden.

Die erfolgreiche Transformation von *Ricinus* ist zwar prinzipiell möglich, aber gleichzeitig mit einem äußerst aufwendigen Transformations- bzw. Regenerationsprozess verbunden. Während sich erste Anstrengungen noch auf vegetative Gewebe fokussierten und sich als ineffizient herausstellten, konzentrierte man sich später auf meristem-basierte Methoden, um die Regenerationseffizienz zu erhöhen (Reddy *et al.*, 1987; Reddy & Bahadur, 1989; Sarvesh *et al.*, 1992; Molina & Schobert, 1995; Lakshmi & Bahadur, 1997; Sujatha & Reddy, 1998). Dabei ist, anders als beispielsweise bei Tabak, die Regeneration von Pflanzen aus Kalluskulturen von *Ricinus* problematisch (Severino *et al.*, 2012) und die Produktion transgener Pflanzen durch das Fehlen eines effizienten Regenerationsprotokolls eingeschränkt (Sujatha *et al.*, 2008).

McKeon und Chen (US-Patent 6620986, 2003) beschrieben als erste die Transformation von *Ricinus*. Hier wurden u. a. die weiblichen Blütenknospen einer Pflanze durch leichtes Anritzen verwundet und die entsprechende Agrobakterien-Suspension aufgebracht. Nach der Samenreife wurden die Samen geerntet, zur Keimung gebracht und mit Kanamycin transgene Keimlinge selektiert. Seitdem wurde eine effizientere Agrobakterien-vermittelte Transformationsmethode beschrieben (Sujatha & Sailaja, 2005; Severino *et al.*, 2012), die schließlich auch die Vorlage in dieser Arbeit bildete.

Aufgrund der insgesamt sehr niedrigen Transformationsrate (0.08 % bei Sujatha und Sailaja, 2005) gibt es heute für *Ricinus* dennoch nur wenige Berichte einer erfolgreichen Transformation und Regeneration, wobei die meisten auf der Verwendung meristematischen Gewebes oder Gewebes der Triebspitzen basieren (Sujatha *et al.*, 2008; Severino *et al.*, 2012). Beispielsweise wurde eine erfolgreiche *in vitro* Regeneration von *Ricinus*-Sprossen auf Nährmedium erhalten, das sich durch einen reduzierten Gehalt an  $\text{NO}_3$  und  $\text{NH}_4$  sowie das Fehlen von  $\text{FeSO}_4$  (Bertozzo & Machado, 2010; Severino *et al.*, 2012) bzw. durch eine geeignete Konzentration an Auxinen auszeichnete (Severino *et al.*, 2012). Auch konnte gezeigt werden, dass die Induktion von Trieben aus Embryonen in Nährmedium mit Thidiazuron und 300 g/kg Glucose ergiebiger war (Carvalho *et al.*, 2008; Severino *et al.*, 2012). Alam *et al.* beschrieben ein Protokoll zur *in vitro* Induktion von Trieben und Wurzeln aus den Knoten der Kotyledonen von Keimlingen (Alam *et al.*, 2010). Sujatha *et al.* geben eine detaillierte Übersicht der Gewebekultur von *Ricinus* (Sujatha *et al.*, 2008).

In zukünftigen Untersuchungen müssten also einerseits die Bedingungen für eine *Agrobacterium*-vermittelte Transformation optimiert, andererseits müssten geeignete Gewebe zur Transformation gefunden sowie entsprechende Kultivierungsbedingungen definiert werden, um daraus schließlich zuverlässig transgene Pflanzen generieren können. Dabei sind neben den zur Transformation verwendeten Geweben insbesondere der verwendete Agrobakterien-Stamm, die Zelldichte, der Zusatz von Acetosyringon sowie eine entsprechende Verwundung des zu transformierenden

Materials, die Inkubationszeit, die Zusammensetzung des Nährmediums im Allgemeinen und der Zusatz von Phytohormonen im Besonderen wichtige Parameter, die das Ergebnis ggf. beeinflussen können (Sujatha & Sailaja, 2005).

Obwohl *Ricinus communis* im Rahmen der vorliegenden Arbeit als Applikationssystem antiplasmodial wirksamer Proteine durchaus geeignet erscheint, könnte sich dieser Ansatz aufgrund der oben beschriebenen Problematik dennoch als nur schwer umsetzbar herausstellen. Daher sollten ggf. auch alternative Applikationswege in Erwägung gezogen werden, wie beispielsweise – sofern möglich – die Transformation anderer für *Anopheles* attraktiver Blütenpflanzen. Auch die Anwendung einer den „attractive toxic sugar baits“ (ATSB) ähnlichen Methode (Beier *et al.*, 2012), könnte unter Umständen als Applikationssystem untersucht werden. Als *attractive toxic sugar baits* werden Zuckerlösungen, die ein risikoarmes Gift wie Borsäure enthalten, entweder auf Pflanzen gesprüht oder in Köder-Stationen angeboten, wobei die Moskitos von dem Köder angezogen und durch das mit der Zuckerlösung aufgenommene Gift getötet werden. Methoden mit *attractive toxic sugar baits* sind eine neue und vielversprechende Strategie zur Moskito-Kontrolle (Beier *et al.*, 2012). Ein Nachteil dieser Methode könnte allerdings, ähnlich wie beim Einsatz von Insektiziden, in der Entstehung von Resistenzen liegen. Der Einsatz von Köderlösungen mit antiplasmodial wirksamen Proteinen oder Peptiden, die einerseits mit Strukturen im Mitteldarm von *Anopheles* interagieren, andererseits aber den Vektor dadurch nicht beeinflussen sondern lediglich *Plasmodium* in seiner Entwicklung inhibieren, können hier den Vorteil einer reduzierten Resistenzentwicklung bieten. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, könnten die entsprechenden Proteine im transienten pflanzlichen Expressionssystem im höheren Milligrammbereich produziert und *Anopheles* in einer zuckerhaltigen Köderlösung angeboten werden. Dabei erscheinen wiederum die gegenüber proteolytischen und thermischen Einflüssen äußerst stabilen Cystin-Knoten-Mikroproteine für diesen Ansatz besonders geeignet.

## **4.2 Inhibitorische Wirksamkeit der Kandidatenproteine in Fütterungsexperimenten mit *Anopheles stephensi***

Fütterungsexperimente mit *Anopheles* bildeten hier die Grundlage des Ansatzes einer Applikation antiplasmodial wirksamer Agenzien mit dem Ziel, die Entwicklung von *Plasmodium* zu stören und damit die Transmission auf den Menschen zu senken. Daher wurden die in den verschiedenen Expressionssystemen (*Nicotiana benthamiana*, *E. coli*) produzierten Kandidatenproteine, die entweder als potentielle Inhibitoren (SM1, PcFK1, PcFK2) oder - als plasmodiale Antigene (P25, P28) - als kompetitive Antagonisten nach Ingestion an bestimmte Strukturen innerhalb des Moskitos binden sollten, in Fütterungsexperimenten mit *Anopheles stephensi* hinsichtlich ihrer antiplasmodialen Wirksamkeit untersucht (Tab. 4.6).

Da für PcFK1 und PcFK2, den antiplasmodial wirksamen Peptiden aus dem Toxin von *Psalmopoeus cambridgei*, die *in vitro* eine starke antiplasmodiale Wirksamkeit gegen die intra-erythrozytären Stadien von *Plasmodium falciparum* zeigten (Choi *et al.*, 2004; Pimentel *et al.*, 2006), der molekulare Angriffspunkt und Wirkmechanismus nicht bekannt sind, sollte anhand der Fütterungsexperimente eine mögliche inhibitorische Wirksamkeit auch auf die Sexualstadien von *Plasmodium berghei* untersucht werden. Für das von Ghosh *et al.* im Jahre 2001 mithilfe einer Phagenbibliothek identifizierte SM1-Peptid, das mit hoher Affinität sowohl an die luminal Seite des Mitteldarmepithels als auch an die distalen Speicheldrüsenlappen von *Anopheles stephensi* bindet (Ghosh *et al.*, 2001), konnte bereits gezeigt werden, dass durch seine Sezernierung ins Mitteldarm-lumen transgener Moskitos eine Inhibition der Oocysten-Bildung bewirkt werden kann (Ito *et al.*, 2002). Die Wirkung auf die Bildung von Oocysten bzw. Sporozoiten nach Ingestion des Peptids durch *Anopheles* wurde dagegen noch nicht hinreichend untersucht. Allerdings gaben erste Fütterungsversuche mit TRX:AGRP-SM1 und einem TRX:PcFK1/TRX:PcFK2-Gemisch, gereinigt aus *E. coli* Origami(DE3) pLysS, Hinweise auf eine mögliche inhibitorische Wirksamkeit (Tan Thanh Huynh, 2009, Diplomarbeit).

Tabelle 4.5: Übersicht der zu Fütterungsexperimenten mit *Anopheles* verwendeten Proteinvarianten unter Angabe des Expressionssystems sowie der applizierten Form der Proteine (Gesamtproteinextrakt/Rohextrakt bzw. gereinigtes Protein) und der in dieser Arbeit untersuchten Funktion.

Varianten	Expressionssystem, Applikationsform	untersuchte Funktion
GFP	<i>N. benthamiana</i> (Rohextrakt, ger. Protein)	Negativ-Kontrolle
TRX:MCoTI-II	<i>E. coli</i> Origami(DE3) (ger. Protein)	Negativ-Kontrolle
GFP:MCoTI-II	<i>N. benthamiana</i> (ger. Protein)	
TRX:MCoTI-II-SM1	<i>E. coli</i> Origami(DE3) (ger. Protein)	Inhibitor
GFP:MCoTI-II-SM1	<i>N. benthamiana</i> (ger. Protein)	
TRX:AGRP-SM1	<i>E. coli</i> Origami(DE3) (ger. Protein)	Inhibitor
TRX:[SM1] <sub>8</sub>	<i>E. coli</i> Origami(DE3) (ger. Protein)	Inhibitor
GFP:PcFK1	<i>N. benthamiana</i> (Rohextrakt)	Inhibitor
GFP:PcFK2	<i>N. benthamiana</i> (Rohextrakt)	
Pfs25	<i>E. coli</i> BL21(DE3) (ger. Protein)	komp. Inhibitor
Pfs28	<i>E. coli</i> BL21(DE3) (ger. Protein)	komp. Inhibitor

Als Voruntersuchung für die Fütterungsexperimente im Infektionsmodell wurde zunächst geklärt, ob die Proteine, die *Anopheles* zusammen mit der Zuckernährlösung angeboten wurden, von den Moskitos aufgenommen werden und wie lange ein Nachweis in der Mücke möglich ist. Dabei wurden den Moskitos die rekombinanten Proteine rund 24 Stunden mit der Nährlösung angeboten, wobei sowohl der Gesamtproteinextrakt infiltrierten Blattmaterials als auch gereinigte und entsalzte Proteinlösungen getestet wurden.

Mittels Immunoblot konnte so gezeigt werden, dass nicht nur eine Aufnahme der mit der Zuckernährlösung angebotenen Proteine durch die Moskitos erfolgte, sondern diese offensichtlich in Abhängigkeit von der verfütterten Proteinmenge noch bis zu 48 Stunden nach der Applikation nachweisbar waren. Dabei konnte bei der Applikation des Protein-Rohextraktes aus infiltriertem Blattmaterial eine längere Verweildauer der Proteine in der Mücke erreicht werden (48 Stunden im Vergleich zu 24 Stunden bei Applikation der reinen Proteinlösungen). Ob dies ggf. durch die unterschiedlichen Konzentrationsverhältnisse, die Versuchsbedingungen oder tatsächlich durch eine höhere Stabilität der pflanzlich produzierten Varianten im Rohextrakt bedingt wurde, müsste durch weitere Fütterungsversuche geklärt werden.

Darüber hinaus konnte jedoch bei Applikation des Rohextraktes mit steigender Verweildauer der Proteine innerhalb der Moskitos eine verhältnismäßig höhere Menge von Di- bzw. Oligomeren im Vergleich zur ersten Probennahme beobachtet werden. Die Ursache hierfür ist zunächst unbekannt, scheinbar begünstigt das Milieu des Mitteldarms aber die Bildung von Oligomeren bzw. Proteinaggregaten bevor diese abgebaut werden, was sich einerseits günstig auf die Stabilität der Proteine auswirken, andererseits aber auch die für die Bindung und Inhibition wichtigen Epitope maskieren könnte.

Die Voruntersuchungen zeigten, dass der hier gewählte Applikationsweg für die nachfolgenden Fütterungsversuche geeignet ist und eine Stabilität der applizierten Proteine von mindestens 24 bis 48 Stunden angenommen werden kann, wobei die Menge an angebotenem rekombinantem Protein eine entscheidende Rolle zu spielen scheint. Da sich die Bildung der Ookineten und die Invasion des Mitteldarmepithels innerhalb von 24 bis 48 Stunden nach der Blutmahlzeit vollzieht (Ramirez *et al.*, 2009), sollte die Verweildauer der potentiell inhibitorischen Proteine dahingehend ausreichend sein.

In den folgenden Fütterungsexperimenten an infizierten *Anopheles stephensi* wurden sowohl die aus dem Blattmaterial von *N. benthamiana* gewonnenen Gesamtproteinextrakte als auch die gereinigten und entsalzten Proteinlösungen verwendet (Tab. 4.6). Als Test-System für die inhibitorische Wirksamkeit der untersuchten Proteine diente der Maus-Malaria-Erreger *Plasmodium berghei*. In einem ersten Fütterungsversuch zeigten die Rohextrakte von GFP:PcFK1 und GFP:PcFK2 keine inhibitorische Wirksamkeit auf die Entwicklung von *Plasmodium*. Auch durch die Applikation einer gereinigten und entsalzten Lösung von GFP:MCoTI-II-SM1 konnte im Vergleich zu den Kontrollkollektiven keine Inhibition der plasmodialen Entwicklung beobachtet werden. Da an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden konnte, dass der verhältnismäßig große Fusionspartner GFP das Ergebnis ungünstig beeinflusst, wurden in weiteren Experimenten die etwas kleineren Thioredoxin-Varianten des SM1-Peptids

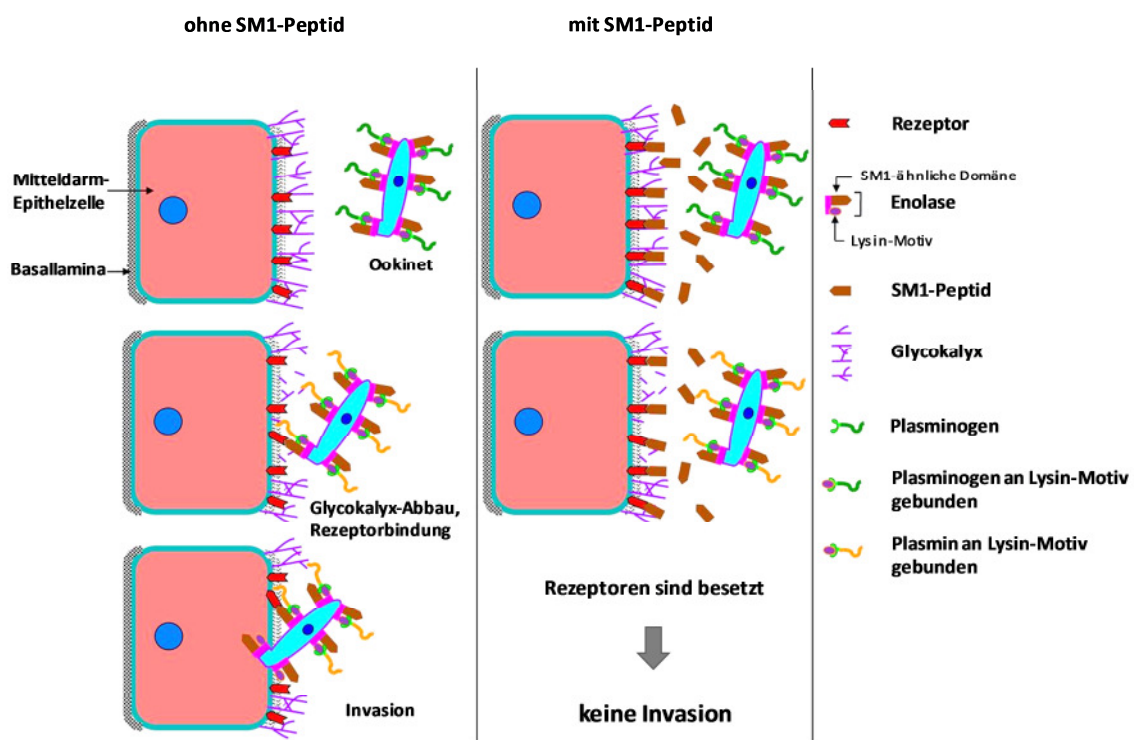
untersucht. Allerdings konnte hier mit TRX:MCoTI-II-SM1 und TRX:AGRP-SM1 zwar eine geringe Reduktion der mittleren Oocystenzahlen im Vergleich zur Kontrolle erreicht werden, das Ausmaß der Reduktion war aber nicht signifikant. Damit konnte hier auch diesen SM1-Varianten kein inhibitorischer Effekt auf die Bildung der Oocysten nachgewiesen werden.

Für ein letztes Fütterungsexperiment wurden die aus *E. coli* BL21(DE3) aufgereinigten Proteine Pfs25 und Pfs28 verwendet. Da diese beiden Proteine innerhalb der Gattung *Plasmodium* hochkonserviert sind (vgl. Kap. 1.4.3; Kap. 3.4), sollte eine inhibitorische Wirksamkeit – sofern grundsätzlich vorhanden – nicht nur bei *P. falciparum* sondern auch bei *P. berghei* prinzipiell nachweisbar sein. Dabei bildete die Überlegung, dass parasitäre Antigene der frühen Sexualstadien nicht nur als Antikörpertarget dienen, sondern nach Ingestion auch als sogenannte kompetitive Antagonisten die für die weitere Entwicklung von *Plasmodium* benötigten Strukturen blockieren könnten, die Grundlage für dieses Experiment. Für P25 und P28 wurde gezeigt, dass sie essentiell sind für das Überleben des Parasiten im Mitteldarm von *Anopheles*, für die Erkennung und Bindung des Mitteldarmepithels sowie die Entwicklung zu Oocysten (Baton & Ranford-Cartwright, 2005; Siden-Kiamos & Louis, 2004; Siden-Kiamos *et al.*, 2000; Tomas *et al.*, 2001). Hier konnte jedoch unter den gewählten Versuchsbedingungen nach Applikation von Pfs25 oder Pfs28 keine signifikante Reduktion der Oocystenzahl erreicht werden.

Die Ursachen für die fehlende inhibitorische Wirksamkeit der getesteten Proteine können dabei – natürlich neben der schlichten Unwirksamkeit - vielfältig sein. Dabei ist selbstverständlich die angebotene bzw. aufgenommene Menge an potentielltem Inhibitor für den Nachweis einer Wirksamkeit entscheidend. Daher muss hier an allererster Stelle in Betracht gezogen werden, dass die Konzentration an Inhibitor für einen Wirksamkeitsnachweis möglicherweise zu gering war, wodurch wiederum die Anforderungen an die Produktion der Proteine insbesondere hinsichtlich der Ausbeute an rekombinantem Protein steigen. Wären die Experimente nicht durch die applizierbare Proteinmenge limitiert, so könnte einerseits der Gehalt der verfütterten Lösungen erhöht, andererseits die Dauer der Fütterung auf mehrere Tage verlängert und so die Anwesenheit der inhibitorischen Proteine im Mitteldarm von *Anopheles* sichergestellt werden. Die Applikation einer zu geringen Menge des inhibitorischen Proteins erscheint insbesondere für die GFP-Fusionsproteine relevant. Hier könnte allerdings auch die Konformation der Fusionsproteine eine mögliche Bindung ungünstig beeinflussen. Wird für PcFK1 und PcFK2 eine inhibitorische Wirksamkeit angenommen, so könnte das negative Ergebnis des Fütterungsexperimentes daher in der Applikation als Fusionsprotein begründet liegen.

Die Beobachtung, dass das SM1-Peptid an die luminale Oberfläche des Mitteldarmepithels bindet und die Invasion von Ookineten inhibiert, implizierte, dass das Peptid durch die Bindung an einen Rezeptor des Mitteldarms kompetitiv die Bindung eines Ookineten-Liganden hemmt, was in der Folge die Invasion verhindert (Gosh *et al.*, 2009; Ghosh *et al.*, 2011). Zur Identifizierung dieser Ookineten-Struktur verwendeten Ghosh *et al.* (2011) den Anti-SM1-Antikörper, der zuvor zur Aufklärung des Zusammenhanges zwischen dem SM1-Peptid und TRAP geführt hatte (Ghosh *et*

*al.*, 2009). So konnten die Autoren nun zeigen, dass dieser Antikörper ein Protein auf der Ookineten-Oberfläche, Enolase, erkennt, welches folglich mit einem putativen Rezeptor des Moskito-Mitteldarms zu interagieren scheint (Ghosh *et al.*, 2011). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das Plasminogen des Blutes durch das Lysin-Motiv (DKSLVK) der Enolase gebunden wird und diese Wechselwirkung nach der Umsetzung zu Plasmin für die Invasion des Mitteldarmepithels essentiell ist (Ghosh *et al.*, 2011). Der putative Rezeptor des Mitteldarms von *Anopheles* wurde jedoch noch nicht identifiziert. Der vermutete Zusammenhang ist in Abbildung 4.1 dargestellt, wobei dieses Beispiel einmal mehr die Komplexität der Entwicklung von *Plasmodium* verdeutlicht.



**Abbildung 4.1. Hypothetisches Modell der Invasion des Mitteldarmepithels und die Rolle von Enolase.** Weitere Erklärungen im Text. Abbildung modifiziert nach Ghosh *et al.*, 2011.

Abbildung 4.1 impliziert jedoch auch, dass eine entsprechende Inhibition der Oocystenbildung nur bei einer ausreichend hohen Konzentration des SM1-Peptids im Mitteldarm erreicht werden kann. Untersuchungen zur inhibitorischen Wirksamkeit des SM1-Peptids wurden bisher in Experimenten mit einer – verglichen mit der vorliegenden Arbeit – deutlich andersartigen Vorgehensweise durchgeführt (Ghosh *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2002; Fang *et al.*, 2011). Dabei variierten jedoch nicht nur die Versuchsbedingungen, sondern auch die Art des getesteten SM1-Peptids. Daher kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die hier verfütterten SM1-Peptid-

Varianten einerseits durch den Fusionspartner GFP bzw. TRX, andererseits durch die Integration in das CKM ihre Fähigkeit zur Bindung der entsprechenden Struktur(en) eingebüßt haben. Allerdings ist für TRX:MCoTI-II eine trypsininhibitorische Aktivität gezeigt worden (Kap. 4.1.1.3), so dass der Fusionspartner TRX hier insgesamt keinen Einfluss auf das CKM und folglich auch nicht auf das hier integrierte SM1-Peptid haben sollte. Dennoch könnte die Konformation des SM1-Peptids durch die Integration in das CKM so verändert sein, dass - unabhängig von der Anwesenheit eines Fusionspartners - eine Bindung nicht oder nur schlecht erfolgen kann. Dabei ist, ebenso wie bei PcFK1 und PcFK2, weiterhin zu beachten, dass das nur 12 Aminosäuren große SM1-Peptid an der Gesamtmasse des Fusionsproteins nur einen kleineren Teil ausmacht, weswegen hier gegenüber dem SM1-Peptid allein die eingesetzte Menge verdreifacht bzw. sogar mehr als verzehnfacht werden müsste.

Da aufgrund der aufwendigen Versuchsdurchführung der *Anopheles*-Fütterungsexperimente die Untersuchungen insgesamt leider nur in einem sehr begrenzten Umfang durchgeführt werden konnten, sollte in weiteren Experimenten auch die antiplasmodiale Wirksamkeit weiterer zur Verfügung stehender Varianten, wie MCoTI002 oder [SM1]<sub>8</sub> aus *N. benthamiana* (Kap. 3.1.2), getestet werden. Darüber hinaus könnte durch weitere Experimente untersucht werden, inwieweit sich die höhere Stabilität der Mikroproteinvarianten im Vergleich zu der oktameren SM1-Variante auf die inhibitorische Wirksamkeit auswirkt oder ob insgesamt ein Unterschied der antiplasmodialen Wirksamkeit der verschiedenen SM1-Varianten untereinander zu beobachten ist. Dabei erscheint ein Unterschied in der inhibitorischen Wirksamkeit von MCoTI-II-SM1 und AGRP-SM1 durch die unterschiedliche Faltung der beiden Mikroproteine wahrscheinlich (Abb. 1.9; Abb. 3.1). Da die funktionale Schleife des AGRP<sub>87-120</sub> eher der Konformation des SM1-Peptids ähnelt, sich also die beiden Moleküle AGRP<sub>87-120</sub> und AGRP-SM1 in dieser Hinsicht sehr ähnlich sind, ist hier - gegenüber MCoTI-II-SM1 - auch die Ausbildung der Disulfidbrücke zwischen den beiden Cysteinen des SM1-Peptids (Abb. 1.3) wahrscheinlicher. Diese ist scheinbar für die inhibitorische Wirksamkeit des SM1-Peptids essentiell (persönliche Mitteilung von Marcelo Jacobs-Lorena).

*Plasmodium* P25 und P28 spielen zwar eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Bindung des Mitteldarmepithels (Siden-Kiamos & Louis, 2004; Siden-Kiamos *et al.*, 2000) und der Entwicklung des Parasiten (Tomas *et al.*, 2001; Baton & Ranford-Cartwright, 2005). Allerdings ergaben Gen-*Knockout*-Experimente, dass nur bei der Ausschaltung beider Gene eine signifikante Inhibition der Invasion der Epithelzellen des Mitteldarms bzw. der Oocysten-Reifung zu beobachten war (Tomas *et al.*, 2001). Dies legt die Vermutung nahe, dass ein inhibitorischer, kompetitiv antagonistischer Effekt auf die Entwicklung von *Plasmodium* in Fütterungsexperimenten mit *Anopheles* möglicherweise ebenfalls nur durch die gleichzeitige Applikation beider Proteine erreicht werden könnte. Darüber hinaus war die Konzentration an rekombinantem Protein in den verfütterten Lösungen sehr niedrig und daher für eine inhibitorische Wirksamkeit wahrscheinlich zu gering. Nach einer Optimierung des Expressionssystems und gegebenenfalls der Überprüfung einer korrekten Faltung der rekombinanten Proteine könnte in zukünftigen Untersuchungen eine



Kombination beider Proteine verabreicht und der Test auf eine inhibitorische Wirksamkeit wiederholt werden.

Zusammenfassend sollten aufgrund der beschränkten Versuchskapazitäten und -modalitäten die Experimente für ein abschließendes Ergebnis wiederholt und die Versuchsparameter (Proteinvariante, Proteinmenge, Applikationszeitraum, Kombination mehrerer Proteine) entsprechend variiert werden. Da die hier durchgeführten Fütterungsexperimente als ein erster Test der antiplasmodialen Aktivität zu verstehen sind, sollte die inhibitorische Wirksamkeit und damit die Verwirklichung dieses Ansatzes also in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

### 4.3 Fazit und Ausblick

In den letzten Jahren wurden verschiedene Peptide, Proteine und Antikörper beschrieben, die mit Oberflächenstrukturen der verschiedenen Sexualstadien von *Plasmodium* bzw. bestimmten Strukturen innerhalb der Stechmücke interagieren und durch Applikation als sogenannte *transmission blocking vaccines* (TBV) die Übertragung des Parasiten auf den Menschen reduzieren können. In diesem Zusammenhang konnte die vorliegende Arbeit insbesondere durch die Produktion antiplasmodialer Peptide bzw. plasmodialer Antigene die Grundlagen für einen alternativen Ansatz schaffen, der zusammen mit traditionellen und bereits etablierten Strategien dazu beitragen könnte, die Transmission der Malaria zu senken.

Als potentielle inhibitorische Kandidatenproteine konnten verschiedene Varianten des *salivary gland and midgut peptide 1* (SM1-Peptid) sowie der antiplasmodialen Peptide PcFK1 und PcFK2 aus dem Toxin der Vogelspinne *Psalmopoeus cambridgei* sowohl im bakteriellen als auch im transienten pflanzlichen Expressionssystem im Milligramm-Maßstab produziert und charakterisiert werden. Durch den Nachweis der Aktivität der Varianten des Cystin-Knoten-Mikroproteins MCoTI-II konnte gezeigt werden, dass beide Expressionssysteme biologisch aktives Protein lieferten. Am Beispiel des MCoTI-II konnte zudem zum ersten Mal die rekombinante Produktion funktioneller Cystin-Knoten-Mikroproteine im pflanzlichen Expressionssystem gezeigt werden.

Darüber hinaus konnten die A-Domäne des *P. berghei* TRAP, Pfs25 und Pfs28 als plasmodiale Antigene sowie das *Anopheles* Saglin als Zielstruktur im Moskito heterolog im bakteriellen Expressionssystem produziert werden. Dies bildet die Basis für weitere Arbeiten, in denen durch die Verfügbarkeit der Proteine unter Verwendung einer Phagenbibliothek die Identifikation bindender Strukturen möglich ist. In diesem Zusammenhang konnten die Proteine mit dem Ziel der Gewinnung camelider Antikörper zur Immunisierung eines Alpaka (*Vicugna pacos*, Camelidae) verwendet werden. Die identifizierten antiplasmodialen Antikörperfragmente könnten schließlich wiederum in Pflanzen exprimiert und im Rahmen dieses in der vorliegenden Arbeit aufgezeigten Ansatzes als transmissionsblockierende Agentien angewandt werden.

Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit sowohl die Anwesenheit phloemspezifischer Proteine im Nektar von *Ricinus communis*, als auch die Transformation von *R. communis* gezeigt werden. *R. communis* erscheint gerade aufgrund seiner zahlreichen extra-floralen Nektarien und seiner Verbreitung in den Tropen und Subtropen als Applikationssystem antiplasmodialer Peptide geeignet. Allerdings konnte durch das Fehlen einer standardisierten, reproduzierbaren Methode mit ausreichender Effizienz kein Nachweis der potentiell inhibitorischen Kandidatenproteine im Nektar erreicht werden. Vor der Untersuchung, ob eine Applikation inhibitorischer Proteine mittels *R. communis* möglich ist, müsste daher die Entwicklung einer effizienteren Transformationsmethode stehen. Gegebenenfalls sollte darüber hinaus ein alternativer Applikationsweg der inhibitorischen Proteine - wie die Verabreichung mittels zuckerhaltiger Köderlösungen - in Erwägung gezogen werden.

Untersuchungen zur inhibitorischen Wirksamkeit erfolgten durch Fütterungsexperimente mit *Anopheles*, denen die Peptide mit einer Zuckermahlzeit verabreicht wurden. Entgegen der Erwartungen konnte in ersten Untersuchungen durch die Analyse der Entwicklung von *P. berghei* keine inhibitorische Wirksamkeit der getesteten Proteinvarianten beobachtet werden. Als Ursache hierfür werden jedoch hauptsächlich die Versuchsmodalitäten angesehen, da z. B. nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Konzentrationen der getesteten Proteinlösungen für eine inhibitorische Wirksamkeit zu gering waren. Eine Aussage über die Wirksamkeit der Proteinvarianten im Allgemeinen muss daher in weiteren Untersuchungen gefunden werden.

Sollte jedoch die Wirksamkeit der Kandidatenproteine in zukünftigen Fütterungsexperimenten mit *Anopheles* gezeigt werden können, so könnte dieser Ansatz in der Kombination mit anderen Strategien dazu beitragen, die Transmission von *Plasmodium* auf den Menschen zu senken, insbesondere in Gegenden, wo andere Maßnahmen nicht oder nicht mehr umgesetzt werden können. Neben einem pflanzlichen Applikationssystem könnten die inhibitorischen Peptide den Moskitos auch mittels einer zuckerhaltigen Köderlösung verabreicht werden. Da hier Strukturen des Moskitos das Ziel sind und gleichzeitig aber *Anopheles* selbst nicht beeinträchtigt wird, kann dieser Ansatz darüber hinaus den Vorteil einer reduzierten Resistenzentwicklung bieten. Weiterhin könnte dieser Ansatz auch auf ähnliche durch Stechmücken übertragene Infektionskrankheiten, wie z. B. Leishmaniose, übertragen werden.

## 5. Zusammenfassung

Auf der Suche nach neuen Möglichkeiten im Kampf gegen die Malaria werden auch innovative Ideen und neue, ungewöhnliche Strategien diskutiert und verfolgt, die angesichts zahlreicher Rückschläge bei der Anwendung etablierter Maßnahmen zunehmend an Bedeutung gewinnen. Der vorliegenden Arbeit liegt die Idee zugrunde, durch die Applikation inhibitorischer Proteine mittels transgener Pflanzen die Entwicklung des Parasiten im Vektor *Anopheles* zu hemmen und in der Folge die Malaria-Transmission zu reduzieren. Da auch weibliche *Anopheles*-Moskitos Pflanzensäfte als Zuckerquelle nutzen (Foster, 1995), sollte die Aufnahme der antiplasmodial wirksamen Proteine durch transgene Pflanzen erfolgen, welche die entsprechenden Proteine in ihrem Nektar akkumulieren. Die aufgenommenen Proteine sollten entweder mit Strukturen des Mitteldarms bzw. der Speicheldrüse von *Anopheles* oder den entsprechenden Entwicklungsstadien von *Plasmodium* interagieren, um in der Folge die Transmission des Parasiten auf den Menschen zu reduzieren. Ziele dieser Arbeit waren daher die Produktion entsprechender Kandidatenproteine, die Evaluation ihrer antiplasmodialen Wirksamkeit in Fütterungsexperimenten mit *Anopheles* sowie die Etablierung von *Ricinus communis* als pflanzliches Applikationssystem der antiplasmodialen Proteine.

In den vergangenen Jahren konnten verschiedene Proteine identifiziert werden, die durch eine Interaktion mit den Sexualstadien von *Plasmodium* die Entwicklung des Parasiten inhibieren und so eine Übertragung reduzieren können. Nachdem für das synthetische Dodecapeptid *salivary gland and midgut peptide 1* (SM1-Peptid; Ghosh *et al.*, 2001) in transgenen Moskitos eine Inhibition der Entwicklung von *Plasmodium* gezeigt werden konnte (Ito *et al.*, 2002), stellte sich in der vorliegenden Arbeit die Frage, ob diese Wirkung auch nach einer oralen Aufnahme dieses Peptids bzw. weiterer Kandidatenproteine durch *Anopheles* nachgewiesen werden kann. Um die antiplasmodiale Wirksamkeit in Fütterungsexperimenten mit *Anopheles* untersuchen zu können, wurden daher verschiedene Varianten des SM1-Peptids sowie der antiplasmodial wirksamen Peptide PcFK1 und PcFK2 aus dem Toxin von *Psalmopoeus cambridgei* (Choi *et al.*, 2004) im bakteriellen und transienten pflanzlichen Expressionssystem produziert und charakterisiert. Dabei konnte durch den positiven Nachweis der trypsininhibitorischen Aktivität des zur Erhöhung der Stabilität als Grundgerüst verwendeten Cystin-Knoten-Mikroproteins MCoTI-II die korrekte Faltung der in den beiden verschiedenen Expressionssystemen produzierten Proteine gezeigt werden. Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit am Beispiel des CKM MCoTI-II aus *Momordica cochinchinensis* zum ersten Mal die rekombinante Produktion eines funktionellen Cystin-Knoten-Mikroproteins in Pflanzen beschrieben werden.

Weiterhin konnten als plasmodiale Antigene die A-Domäne des *thrombospondin-related anonymous protein* (TRAP) der Sporozoiten von *P. berghei*, die Ookineten-Oberflächenproteine P25 und P28 von *P. falciparum* sowie das Speicheldrüsenprotein Saglin von *Anopheles* als Zielstruktur des Vektors im bakteriellen Expressionssystem produziert werden. Die Proteine

konnten daher zur Gewinnung antiplasmodialer Antikörperfragmente verwendet werden, die in zukünftigen Arbeiten ihrerseits als transmissionsblockierende Proteine angewandt werden können.

Als Applikationssystem für antiplasmodiale Proteine erscheint in diesem Zusammenhang der in tropischen und subtropischen Ländern weit verbreitete *Ricinus communis* mit seinen extrafloralen Nektarien geeignet, wenn diese im Phloemsaft bzw. im Nektar akkumuliert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass phloemspezifische Proteine auch in den Nektar der Pflanze sezerniert werden. Daher wurde die stabile Expression der inhibitorischen Peptide unter Verwendung des phloemspezifischen *SUC2*-Promotors aus *A. thaliana* (*AtSUC2*) in *R. communis* versucht. Da *Ricinus* jedoch nur äußerst schwer zu transformieren und regenerieren ist, konnte ein Nachweis der inhibitorischen Kandidatenproteine im Nektar im gegebenen Zeitrahmen aber nicht erreicht werden.

Die Untersuchung der antiplasmodialen Wirksamkeit der Kandidatenproteine auf *P. berghei* erfolgte in Fütterungsversuchen mit infizierten *A. stephensi*, wobei jedoch keine signifikante inhibitorische Wirksamkeit der in diesem Rahmen getesteten Proteinvarianten beobachtet werden konnte. Da diese Ergebnisse jedoch als erste Tests dieses Ansatzes zu verstehen sind, sollten sich hier weitere Untersuchungen anschließen.

Zusammenfassend konnte diese Arbeit die Grundlagen für die Entwicklung eines alternativen Ansatzes legen, der letztendlich zusammen mit anderen, bereits etablierten Strategien und Maßnahmen, wie z. B. dem Einsatz von Insektiziden und insektizid-beschichteten Bettnetzen oder der Behandlung mit Malaria-Therapeutika, zur Senkung der Transmission der Malaria beitragen könnte.

## 6. Summary

In search of new ways of fighting malaria innovative ideas and unusual strategies are increasingly discussed and pursued due to numerous setbacks in the application of established measures. The present work is based on the idea of interfering with *Plasmodium* development in its mosquito vector by the application of inhibitory proteins via transgenic plants, thus reducing malaria transmission. As even female *Anopheles* mosquitoes utilize plant nectars as a common sugar source (Foster, 1995), the uptake of *Plasmodium*-inhibitory proteins should be feasible via transgenic plants that accumulate the relevant proteins in their nectar. The ingested proteins are supposed to interact with surface structures of both the *Anopheles* gut and salivary glands, or with the relevant *Plasmodium* life-cycle stages, and subsequently reduce transmission of the parasite to humans. In this approach, the particular objectives were the production of the relevant candidate proteins, the evaluation of their inhibitory efficacy in *Anopheles* feeding experiments, and the establishment of *Ricinus communis* as a plant delivery system of the antiplasmodial proteins.

In recent years, several proteins have been identified as being capable of interfering with the *Plasmodium* sexual stages, thus inhibiting the development of the parasite, and therefore, the transmission to humans. Since the synthetic dodecapeptide, salivary gland and midgut peptide 1 (SM1 peptide; Ghosh *et al.*, 2001), revealed an inhibitory effect on *Plasmodium* development in transgenic mosquitoes (Ito *et al.*, 2002), it should be evaluated, whether this effect could also be detected after oral ingestion of the peptide or other inhibitory proteins. To investigate the inhibitory activity in feeding experiments with *Anopheles*, different variants of both the SM1 peptide and the antiplasmodial peptides from the venom of *Psalmopoeus cambridgei*, PcFK1 and PcFK2 (Choi *et al.*, 2004), were produced via bacterial and plant expression systems. It was shown by the detection of trypsin inhibition of the stabilizing microprotein scaffold MCoTI-II, that plant and *E. coli* produced proteins exhibit correct folding. In addition, this work is the first report on the recombinant production of a functional cystine-knot microprotein in plants using MCoTI-II from *Momordica cochinchinensis*. Furthermore, both, the A-domain of *P. berghei* thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) and the ookinete surface proteins P25 and P28 of *P. falciparum* as plasmodial antigens, as well as the *Anopheles* salivary gland protein, saglin, could be produced via bacterial expression. Thus, these proteins could be provided for the recovery of antiplasmodial antibody fragments, which subsequently could also be investigated as transmission blocking proteins.

In this context *Ricinus communis*, which is widespread throughout tropical and subtropical regions and possesses many extra floral nectaries, appears to be suited for the application of antiplasmodial proteins if they were expressed in the phloem sap or nectar, respectively. In the present study, it was shown that phloem specific proteins are secreted into the nectar. Thus, the stable expression of the relevant proteins in *R. communis* under the control of the phloem specific

*SUC2*-promoter of *A. thaliana* (*AtSUC2*) was attempted. Though, since *Ricinus* is recalcitrant to *in vitro* regeneration and transformation, detection of the inhibitory candidate proteins in the *Ricinus* nectar was not feasible within the predetermined time-limit of the project.

The inhibitory potential of the relevant proteins was investigated in *A. stephensi* feeding experiments using *P. berghei* parasites. However, under the selected conditions, no significant inhibitory effect could be detected. As these results were obtained in the first crude experiments of the proposed approach, further investigation should be conducted.

In conclusion, this study provided the basis for the development of an innovative approach, additional to the established strategies and interventions, such as insecticides, insecticide-treated bed nets and antimalarial drugs, for the reduction of malaria transmission.

## 7. Literaturverzeichnis

**N. N. (1985).** A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227, 1229-1231.

**N. N. (2008).** Malaria - Stellungnahme des Arbeitskreises Blut. In: Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz 51, 236-249, DOI 10.1007/s00103-008-0453-5. Springer Medizin Verlag 2008. Online verfügbar unter URL: [http://edoc.rki.de/documents/rki\\_ab/re1cFdAGYmplk/PDF/25EP0ZTzIrmYk.pdf](http://edoc.rki.de/documents/rki_ab/re1cFdAGYmplk/PDF/25EP0ZTzIrmYk.pdf) [12.07.2012].

**Agnandji, S.T., Lell, B., Soulanoudjingar, S.S., Fernandes, J.F., Abossolo, B.P., Conzelmann, C., Methogo, B.G., Doucka, Y., Flamen, A., Mordmuller, B. et al. (2011).** First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. *The New England journal of medicine* 365, 1863-1875.

**Alam, I., Sharmin, S.A., Mondal, S.C., Alam, M.J., Khalekuzzaman, M., Anisuzzaman, M., Alam, M.F. (2010).** In vitro micropropagation through cotyledonary node culture of castor bean (*Ricinus communis* L.). *Aust. J. Crop Sci.* 4, 81-84.

**Aly, A.S.I., Vaughan, A.M., Kappe, S.H.I. (2009).** Malaria Parasite Development in the Mosquito and Infection of the Mammalian Host. *Annu Rev Microbiol* 63, 195-221.

**Appella, E., Weber, I.T., Blasi, F. (1988).** Structure and function of epidermal growth factor-like regions in proteins. *FEBS letters* 231, 1-4.

**Arrighi, R.B., Hurd, H. (2002).** The role of *Plasmodium berghei* ookinete proteins in binding to basal lamina components and transformation into oocysts. *International journal for parasitology* 32, 91-98.

**Athma, P., Reddy, T.P. (1983).** Efficiency of callus initiation and direct regeneration from different explants of castor (*Ricinus communis* L.). *Curr Sci* 52, 256-257.

**Auld, D.L., Rolfe, R.D., McKeon, T.A. (2001).** Development of castor with reduced toxicity. *J New Seeds* 3, 61-69.

**Avrutina, O., Schmoldt, H.U., Gabrijelcic-Geiger, D., Le Nguyen, D., Sommerhoff, C.P., Diederichsen, U., Kolmar, H. (2005).** Trypsin inhibition by macrocyclic and open-chain variants of the squash inhibitor MCoTI-II. *Biol Chem* 386, 1301-1306.

**Badri, M.A., Rivard, D., Coenen, K., Michaud, D. (2009).** Unintended molecular interactions in transgenic plants expressing clinically useful proteins: the case of bovine aprotinin traveling the potato leaf cell secretory pathway. *Proteomics* 9, 746-756.

**Balachandran, S., Xiang, Y., Schobert, C., Thompson, G.A., Lucas, W.J. (1997).** Phloem sap proteins from *Cucurbita maxima* and *Ricinus communis* have the capacity to traffic cell to cell

through plasmodesmata. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *94*, 14150-14155.

**Ballou, W.R. (2009).** The development of the RTS,S malaria vaccine candidate: challenges and lessons. *Parasite immunology* *31*, 492-500.

**Barnes, A., Bale, J., Constantinidou, C., Ashton, P., Jones, A., Pritchard, J. (2004).** Determining protein identity from sieve element sap in *Ricinus communis* L. by quadrupole time of flight (Q-TOF) mass spectrometry. *Journal of experimental botany* *55*, 1473-1481.

**Barr, P.J., Green, K.M., Gibson, H.L., Bathurst, I.C., Quakyi, I.A., Kaslow, D.C. (1991).** Recombinant Pfs25 protein of *Plasmodium falciparum* elicits malaria transmission-blocking immunity in experimental animals. *The Journal of experimental medicine* *174*, 1203-1208.

**Barreau, C., Conrad, J., Fischer, E., Lujan, H.D., Vernick, K.D. (1999).** Identification of surface molecules on salivary glands of the mosquito, *Aedes aegypti*, by a panel of monoclonal antibodies. *Insect biochemistry and molecular biology* *29*, 515-526.

**Barreau, C., Touray, M., Pimenta, P.F., Miller, L.H., Vernick, K.D. (1995).** *Plasmodium gallinaceum*: sporozoite invasion of *Aedes aegypti* salivary glands is inhibited by anti-gland antibodies and by lectins. *Experimental parasitology* *81*, 332-343.

**Baruch, D.I. (1999).** Adhesive receptors on malaria-parasitized red cells. *Bailliere's best practice & research Clinical haematology* *12*, 747-761.

**Baruch, D.I., Pasloske, B.L., Singh, H.B., Bi, X., Ma, X.C., Feldman, M., Taraschi, T.F., Howard, R.J. (1995).** Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell* *82*, 77-87.

**Baton, L.A., Ranford-Cartwright, L.C. (2005).** Do malaria ookinete surface proteins P25 and P28 mediate parasite entry into mosquito midgut epithelial cells? *Malaria J* *4*.

**Becker, D., Kemper, E., Schell, J., Masterson, R. (1992).** New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Molecular Biology* *20*, 1195-1197.

**Beerntsen, B.T., James, A.A., Christensen, B.M. (2000).** Genetics of mosquito vector competence. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR *64*, 115-137.

**Beier, J.C. (1998).** Malaria parasite development in mosquitoes. *Annu Rev Entomol* *43*, 519-543.

**Beier, J.C., Muller, G.C., Gu, W., Arheart, K.L., Schlein, Y. (2012).** Attractive toxic sugar bait (ATSB) methods decimate populations of *Anopheles* malaria vectors in arid environments regardless of the local availability of favoured sugar-source blossoms. *Malaria journal* *11*, 31.

**Benchabane, M., Goulet, C., Rivard, D., Faye, L., Gomord, V., Michaud, D. (2008).** Preventing unintended proteolysis in plant protein biofactories. *Plant biotechnology journal* *6*, 633-648.

**Bergmann, S., Rohde, M., Chhatwal, G.S., Hammerschmidt, S. (2001).** alpha-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Molecular microbiology* *40*, 1273-1287.



**Bertani, G. (2004).** Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. *Journal of bacteriology* 186, 595-600.

**Bertoazzo, F., Machado, I.S. (2010).** Culture media on in vitro development of castor bean (*Ricinus communis* L.) stem tips. *Ciencia Agrotecnol.* 34,1477-1482. (In Portugiesisch, mit Englisch-sprachiger Zusammenfassung.)

**Bessette, P.H., Aslund, F., Beckwith, J., Georgiou, G. (1999).** Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 13703-13708.

**Birnboim, H.C., Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* 7, 1513-1523.

**Blanco, A.R., Paez, A., Gerold, P., Dearsly, A.L., Margos, G., Schwarz, R.T., Barker, G., Rodriguez, M.C., Sinden, R.E. (1999).** The biosynthesis and post-translational modification of Pbs21 an ookinete-surface protein of *Plasmodium berghei*. *Molecular and biochemical parasitology* 98, 163-173.

**Blum, H., Beier, H., Gross, H.J. (1987).** Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in PAA gels. *Electrophoresis* 8, 93-99.

**Bode, W., Huber, R. (1992).** Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *European journal of biochemistry / FEBS* 204, 433-451.

**Bolin, K.A., Anderson, D.J., Trulson, J.A., Thompson, D.A., Wilken, J., Kent, S.B., Gantz, I., Millhauser, G.L. (1999).** NMR structure of a minimized human agouti related protein prepared by total chemical synthesis. *FEBS letters* 451, 125-131.

**Brennan, J.D.G., Kent, M., Dhar, R., Fujioka, H., Kumar, N. (2000).** *Anopheles gambiae* salivary gland proteins as putative targets for blocking transmission of malaria parasites. *P Natl Acad Sci USA* 97, 13859-13864.

**Carter, R. (2001).** Transmission blocking malaria vaccines. *Vaccine* 19, 2309-2314.

**Carter, R., Mendis, K.N., Miller, L.H., Molineaux, L., Saul, A. (2000).** Malaria transmission-blocking vaccines--how can their development be supported? *Nature medicine* 6, 241-244.

**Carvalho, J.M.F.C., Silva, M.M.A., Medeiros, M.J.L., Araujo, S.S., Milani, M. (2008).** Composition and concentrations of the culture medium in the multiple shoots in vitro of castor bean cultivating BRS Paraguacu. *Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibras* 12, 119-124. (In Portugiesisch, mit Englisch-sprachiger Zusammenfassung.)

**Casares, S., Brumeanu, T.D., Richie, T.L. (2010).** The RTS,S malaria vaccine. *Vaccine* 28, 4880-4894.

**Caupin, H.J. (1997).** Products from castor oil: Past, present, and future. In: *Lipid Technologies and Applications*. Gunstone, F.D., Padley, F.B. (eds). Marcel Dekker, New York, 787-795.

**Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C. (1994).** Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-805.

**Chen, Q., Schlichtherle, M., Wahlgren, M. (2000).** Molecular aspects of severe malaria. *Clinical microbiology reviews* 13, 439-450.

**Chiche, L., Heitz, A., Gelly, J.C., Gracy, J., Chau, P.T., Ha, P.T., Hernandez, J.F., Le-Nguyen, D. (2004).** Squash inhibitors: from structural motifs to macrocyclic knottins. *Current protein & peptide science* 5, 341-349.

**Choi, S.J., Parent, R., Guillaume, C., Deregnaucourt, C., Delarbre, C., Ojcius, D.M., Montagne, J.J., Celerier, M.L., Phelipot, A., Amiche, M. *et al.* (2004).** Isolation and characterization of Psalmopeotoxin I and II: two novel antimalarial peptides from the venom of the tarantula *Psalmopoeus cambridgei*. *Febs Lett* 572, 109-117.

**Christmann, A., Walter, K., Wentzel, A., Kratzner, R., Kolmar, H. (1999).** The cystine knot of a squash-type protease inhibitor as a structural scaffold for *Escherichia coli* cell surface display of conformationally constrained peptides. *Protein engineering* 12, 797-806.

**Christou, P. (1995).** Particle bombardment. *Methods in cell biology* 50, 375-382.

**Clemente, M., Corigliano, M.G. (2012).** Overview of Plant-Made Vaccine Antigens against Malaria. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2012, 206918.

**Cohen, J., Nussenzweig, V., Nussenzweig, R., Vekemans, J., Leach, A. (2010).** From the circumsporozoite protein to the RTS, S/AS candidate vaccine. *Human vaccines* 6, 90-96.

**Colgrave, M.L., Craik, D.J. (2004).** Thermal, chemical, and enzymatic stability of the cyclotide kalata B1: the importance of the cyclic cystine knot. *Biochemistry* 43, 5965-5975.

**Conrad, U., Fiedler, U. (1998).** Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity. *Plant molecular biology* 38, 101-109.

**Coppi, A., Natarajan, R., Pradel, G., Bennett, B.L., James, E.R., Roggero, M.A., Corradin, G., Persson, C., Tewari, R., Sinnis, P. (2011).** The malaria circumsporozoite protein has two functional domains, each with distinct roles as sporozoites journey from mosquito to mammalian host. *The Journal of experimental medicine* 208, 341-356.

**Craik, D.J., Daly, N.L., Bond, T., Waite, C. (1999).** Plant cyclotides: A unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif. *Journal of molecular biology* 294, 1327-1336.

**Craik, D.J., Daly, N.L., Mulvenna, J., Plan, M.R., Trabi, M. (2004).** Discovery, structure and biological activities of the cyclotides. *Current protein & peptide science* 5, 297-315.

**Craik, D.J., Daly, N.L., Waite, C. (2001).** The cystine knot motif in toxins and implications for drug design. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 39, 43-60.

**Craik, D.J., Swedberg, J.E., Mylne, J.S., Cemazar, M. (2012).** Cyclotides as a basis for drug design. *Expert Opin. Drug Discov.* 7, 179-194.

**Czapinska, H., Otlewski, J. (1999).** Structural and energetic determinants of the S1-site specificity in serine proteases. *European journal of biochemistry / FEBS* 260, 571-595.

**Daly, N.L., Craik, D.J. (2011).** Bioactive cystine knot proteins. *Current opinion in chemical biology* 15, 362-368.

**Daniell, H., Singh, N.D., Mason, H., Streatfield, S.J. (2009).** Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. *Trends in plant science* 14, 669-679.

**Daniell, H., Streatfield, S.J., Wycoff, K. (2001).** Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends in plant science* 6, 219-226.

**Davoodi-Semiromi, A., Schreiber, M., Nalapalli, S., Verma, D., Singh, N.D., Banks, R.K., Chakrabarti, D., Daniell, H. (2010).** Chloroplast-derived vaccine antigens confer dual immunity against cholera and malaria by oral or injectable delivery. *Plant biotechnology journal* 8, 223-242.

**Dessens, J.T., Beetsma, A.L., Dimopoulos, G., Wengelnik, K., Crisanti, A., Kafatos, F.C., Sinden, R.E. (1999).** CTRP is essential for mosquito infection by malaria ookinetes. *The EMBO journal* 18, 6221-6227.

**Doran, P.M. (2006).** Foreign protein degradation and instability in plants and plant tissue cultures. *Trends in biotechnology* 24, 426-432.

**Duffy, P.E., Kaslow, D.C. (1997).** A novel malaria protein, Pfs28, and Pfs25 are genetically linked and synergistic as falciparum malaria transmission-blocking vaccines. *Infection and immunity* 65, 1109-1113.

**Duffy, P.E., Pimenta, P., Kaslow, D.C. (1993).** Pgs28 belongs to a family of epidermal growth factor-like antigens that are targets of malaria transmission-blocking antibodies. *The Journal of experimental medicine* 177, 505-510.

**Fang, W., Vega-Rodriguez, J., Ghosh, A.K., Jacobs-Lorena, M., Kang, A., St Leger, R.J. (2011).** Development of transgenic fungi that kill human malaria parasites in mosquitoes. *Science* 331, 1074-1077.

**Farrance, C.E., Chichester, J.A., Musiyчук, K., Shamloul, M., Rhee, A., Manceva, S.D., Jones, R.M., Mamedov, T., Sharma, S., Mett, V. *et al.* (2011a).** Antibodies to plant-produced Plasmodium falciparum sexual stage protein Pfs25 exhibit transmission blocking activity. *Human vaccines* 7 Suppl, 191-198.

**Farrance, C.E., Rhee, A., Jones, R.M., Musiyчук, K., Shamloul, M., Sharma, S., Mett, V., Chichester, J.A., Streatfield, S.J., Roeffen, W. *et al.* (2011b).** A plant-produced Pfs230 vaccine candidate blocks transmission of Plasmodium falciparum. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 18, 1351-1357.

**Felizmenio-Quimio, M.E., Daly, N.L., Craik, D.J. (2001).** Circular proteins in plants - Solution structure of a novel macrocyclic trypsin inhibitor from Momordica cochinchinensis. *J Biol Chem* 276, 22875-22882.

**Fidock, D.A. (2010).** Drug discovery: Priming the antimalarial pipeline. *Nature* 465, 297-298.  
Fischer, R., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P., and Twyman, R.M. (2004). Plant-based production of biopharmaceuticals. *Current opinion in plant biology* 7, 152-158.

**Foster, W.A. (1995).** Mosquito sugar feeding and reproductive energetics. *Annual review of entomology* 40, 443-474.

**Frevert, U. (2004).** Sneaking in through the back entrance: the biology of malaria liver stages. *Trends in Parasitology* 20, 417-424.

**Fries, H.C., Lamers, M.B., van Deursen, J., Ponnudurai, T., Meuwissen, J.H. (1990).** Biosynthesis of the 25-kDa protein in the macrogametes/zygotes of *Plasmodium falciparum*. *Experimental parasitology* 71, 229-235.

**Garcia, A.E., Camarero, J.A. (2010).** Biological activities of natural and engineered cyclotides, a novel molecular scaffold for peptide-based therapeutics. *Current molecular pharmacology* 3, 153-163.

**Garcia, J.E., Puentes, A., Patarroyo, M.E. (2006).** Developmental biology of sporozoite-host interactions in *Plasmodium falciparum* malaria: Implications for vaccine design. *Clin Microbiol Rev* 19, 686.

**Gass, R.F., Yeates, R.A. (1979).** In vitro damage of cultured ookinetes of *Plasmodium gallinaceum* by digestive proteinases from susceptible *Aedes aegypti*. *Acta tropica* 36, 243-252.

**Gelly, J.C., Gracy, J., Kaas, Q., Le-Nguyen, D., Heitz, A., Chiche, L. (2004).** The KNOTTIN website and database: a new information system dedicated to the knottin scaffold. *Nucleic acids research* 32, D156-159.

**Ghosh, A., Edwards, M.J., Jacobs-Lorena, M. (2000).** The journey of the malaria parasite in the mosquito: hopes for the new century. *Parasitology today* 16, 196-201.

**Ghosh, A.K., Coppens, I., Gardsvoll, H., Ploug, M., Jacobs-Lorena, M. (2011).** *Plasmodium* ookinetes coopt mammalian plasminogen to invade the mosquito midgut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 17153-17158.

**Ghosh, A.K., Devenport, M., Jethwaney, D., Kalume, D.E., Pandey, A., Anderson, V.E., Sultan, A.A., Kumar, N., Jacobs-Lorena, M. (2009).** Malaria parasite invasion of the mosquito salivary gland requires interaction between the *Plasmodium* TRAP and the *Anopheles* saglin proteins. *PLoS pathogens* 5, e1000265.

**Ghosh, A.K., Ribolla, P.E.M., Jacobs-Lorena, M. (2001).** Targeting *Plasmodium* ligands on mosquito salivary glands and midgut with a phage display peptide library. *P Natl Acad Sci USA* 98, 13278-13281.

**Ghosh, J.K., Shaoool, D., Guillaud, P., Ciceron, L., Mazier, D., Kustanovich, I., Shai, Y., Mor, A. (1997).** Selective cytotoxicity of dermaseptin S3 toward intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* and the underlying molecular basis. *The Journal of biological chemistry* 272, 31609-31616.

**Ghosh, S., Malhotra, P., Lalitha, P.V., Guha-Mukherjee, S., Chauhan, V.S. (2002).** Expression of *Plasmodium falciparum* C-terminal region of merozoite surface protein (PfMSP1-19), a potential malaria vaccine candidate, in tobacco. *Plant Sci* 162, 335-343.

**Gils, M., Kandzia, R., Marillonnet, S., Klimyuk, V., Gleba, Y. (2005).** High-yield production of authentic human growth hormone using a plant virus-based expression system. *Plant biotechnology journal* 3, 613-620.

- Giritch, A., Marillonnet, S., Engler, C., van Eldik, G., Botterman, J., Klimyuk, V., Gleba, Y. (2006).** Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 14701-14706.
- Girma, J.P., Meyer, D., Verweij, C.L., Pannekoek, H., Sixma, J.J. (1987).** Structure-function relationship of human von Willebrand factor. *Blood* 70, 605-611.
- Glenz, K. (2005).** Entwicklung eines Lipoprotein-Impfstoffes aus Pflanzen: Produktion des rekombinanten 'outer surface protein A' (OspA) von *Borrelia burgdorferi* in Tabakchloroplasten. Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Dissertation.
- Goldberg, D.E., Slater, A.F.G. (1992).** The Pathway of Hemoglobin Degradation in Malaria Parasites. *Parasitology Today* 8, 280-283.
- Gottschalk, M., Dolgener, E., Xoconostle-Cazares, B., Lucas, W.J., Komor, E., Schobert, C. (2008).** Ricinus communis cyclophilin: functional characterisation of a sieve tube protein involved in protein folding. *Planta* 228, 687-700.
- Gould, A., Ji, Y., Aboye, T.L., Camarero, J.A. (2011).** Cyclotides, a novel ultrastable polypeptide scaffold for drug discovery. *Current pharmaceutical design* 17, 4294-4307.
- Gran, L. (1973a).** On the effect of a polypeptide isolated from "Kalata-Kalata" (*Oldenlandia affinis* DC) on the oestrogen dominated uterus. *Acta pharmacologica et toxicologica* 33, 400-408.
- Gran, L. (1973b).** On the isolation of tetramethylputrescine from *Oldenlandia affinis*. *Lloydia* 36, 209-210.
- Gran, L. (1973c).** Oxytocic principles of *Oldenlandia affinis*. *Lloydia* 36, 174-178.
- Graves, P., Gelband, H. (2006).** WITHDRAWN: Vaccines for preventing malaria. Cochrane database of systematic reviews, CD000129.
- Greenwood, K.P., Daly, N.L., Brown, D.L., Stow, J.L., Craik, D.J. (2007).** The cyclic cystine knot miniprotein MCoTI-II is internalized into cells by macropinocytosis. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39, 2252-2264.
- Gruber, C.W., Cemazar, M., Anderson, M.A., Craik, D.J. (2007).** Insecticidal plant cyclotides and related cystine knot toxins. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 49, 561-575.
- Han, Y.S., Thompson, J., Kafatos, F.C., Barillas-Mury, C. (2000).** Molecular interactions between *Anopheles stephensi* midgut cells and *Plasmodium berghei*: the time bomb theory of ookinete invasion of mosquitoes. *Embo J* 19, 6030-6040.
- Hartley, M.R., Lord, J.M. (2004).** Cytotoxic ribosome-inactivating lectins from plants. *Biochimica et biophysica acta* 1701, 1-14.
- Heitz, A., Chiche, L., Le-Nguyen, D., Castro, B. (1989).** 1H 2D NMR and distance geometry study of the folding of *Ecballium elaterium* trypsin inhibitor, a member of the squash inhibitors family. *Biochemistry* 28, 2392-2398.

**Heitz, A., Hernandez, J.F., Gagnon, J., Hong, T.T., Pham, T.T., Nguyen, T.M., Le-Nguyen, D., Chiche, L. (2001).** Solution structure of the squash trypsin inhibitor MCoTI-II. A new family for cyclic knottins. *Biochemistry* 40, 7973-7983.

**Hennig, A., Reinders, Y., Giritch, A., Reinders, J., Warzecha, H. (2008).** Assessment of different expression strategies for production of a recombinant lipoprotein vaccine in plants. *The Open Biotechnology Journal* 2, 51-55.

**Hernandez, J.F., Gagnon, J., Chiche, L., Nguyen, T.M., Andrieu, J.P., Heitz, A., Trinh Hong, T., Pham, T.T., Le Nguyen, D. (2000).** Squash trypsin inhibitors from *Momordica cochinchinensis* exhibit an atypical macrocyclic structure. *Biochemistry* 39, 5722-5730.

**Hilpert, K., Wessner, H., Schneider-Mergener, J., Welfle, K., Misselwitz, R., Welfle, H., Hocke, A.C., Hippenstiel, S., Hohne, W. (2003).** Design and characterization of a hybrid miniprotein that specifically inhibits porcine pancreatic elastase. *The Journal of biological chemistry* 278, 24986-24993.

**Hisaeda, H., Stowers, A.W., Tsuboi, T., Collins, W.E., Sattabongkot, J.S., Suwanabun, N., Torii, M., Kaslow, D.C. (2000).** Antibodies to malaria vaccine candidates Pvs25 and Pvs28 completely block the ability of *Plasmodium vivax* to infect mosquitoes. *Infection and immunity* 68, 6618-6623.

**Hobbs, C., Duffy, P. (2011).** Drugs for malaria: something old, something new, something borrowed. *F1000 biology reports* 3, 24.

**Hofgen, R., Willmitzer, L. (1988).** Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic acids research* 16, 9877.

**Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G., Fraley, R.T. (1985).** A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227, 1229-1231.

**Huang, Z., Santi, L., LePore, K., Kilbourne, J., Arntzen, C.J., Mason, H.S. (2006).** Rapid, high-level production of hepatitis B core antigen in plant leaf and its immunogenicity in mice. *Vaccine* 24, 2506-2513.

**Imlau, A., Truernit, E., Sauer, N. (1999).** Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. *The Plant cell* 11, 309-322.

**Impoinvil, D.E., Kongere, J.O., Foster, W.A., Njiru, B.N., Killeen, G.F., Githure, J.I., Beier, J.C., Hassanali, A., Knols, B.G. (2004).** Feeding and survival of the malaria vector *Anopheles gambiae* on plants growing in Kenya. *Medical and veterinary entomology* 18, 108-115.

**Isaacs, N.W. (1995).** Cystine knots. *Current opinion in structural biology* 5, 391-395.

**Ito, J., Ghosh, A., Moreira, L.A., Wimmer, E.A., Jacobs-Lorena, M. (2002).** Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. *Nature* 417, 452-455.

**Jackson, P.J., McNulty, J.C., Yang, Y.K., Thompson, D.A., Chai, B., Gantz, I., Barsh, G.S., Millhauser, G.L. (2002).** Design, pharmacology, and NMR structure of a minimized cystine knot with agouti-related protein activity. *Biochemistry* 41, 7565-7572.

- James, A.A. (2003).** Blocking malaria parasite invasion of mosquito salivary glands. *The Journal of experimental biology* 206, 3817-3821.
- Jethwaney, D., Lepore, T., Hassan, S., Mello, K., Rangarajan, R., Jahnke-Dechent, W., Wirth, D., Sultan, A.A. (2005).** Fetuin-A, a hepatocyte-specific protein that binds Plasmodium berghei thrombospondin-related adhesive protein: a potential role in infectivity. *Infection and immunity* 73, 5883-5891.
- Kapila, J., DeRycke, R., VanMontagu, M., Angenon, G. (1997).** An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Sci* 122, 101-108.
- Kappe, S., Bruderer, T., Gantt, S., Fujioka, H., Nussenzweig, V., Menard, R. (1999).** Conservation of a gliding motility and cell invasion machinery in Apicomplexan parasites. *The Journal of cell biology* 147, 937-944.
- Kaslow, D.C. (1997).** Transmission-blocking vaccines: uses and current status of development. *International journal for parasitology* 27, 183-189.
- Kaslow, D.C. (2002).** Transmission-blocking vaccines. *Chemical immunology* 80, 287-307.
- Kaslow, D.C., Bathurst, I.C., Lensen, T., Ponnudurai, T., Barr, P.J., Keister, D.B. (1994).** Saccharomyces cerevisiae recombinant Pfs25 adsorbed to alum elicits antibodies that block transmission of Plasmodium falciparum. *Infection and immunity* 62, 5576-5580.
- Kaslow, D.C., Quakyi, I.A., Syin, C., Raum, M.G., Keister, D.B., Coligan, J.E., McCutchan, T.F., Miller, L.H. (1988).** A vaccine candidate from the sexual stage of human malaria that contains EGF-like domains. *Nature* 333, 74-76.
- Kaslow, D.C., Syin, C., McCutchan, T.F., Miller, L.H. (1989).** Comparison of the primary structure of the 25 kDa ookinete surface antigens of Plasmodium falciparum and Plasmodium gallinaceum reveal six conserved regions. *Molecular and biochemical parasitology* 33, 283-287.
- Kirby, J., Kavanagh, T.A. (2002).** NAN fusions: a synthetic sialidase reporter gene as a sensitive and versatile partner for GUS. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 32, 391-400.
- Kolmar, H. (2009).** Biological diversity and therapeutic potential of natural and engineered cystine knot miniproteins. *Current opinion in pharmacology* 9, 608-614.
- Kolmar, H. (2011).** Natural and engineered cystine knot miniproteins for diagnostic and therapeutic applications. *Current pharmaceutical design* 17, 4329-4336.
- Kretschmer, H., Bienzle, U., Klaub, V., Kremsner, P.G., Leichsenring, M. (1996).** Malaria. In: *Tropen- und Reisemedizin*, Knobloch J. (Hrsg). Gustav Fischer Verlag, Jena, 134-163.
- Krotoski, W.A., Collins, W.E., Bray, R.S., Garnham, P.C.C., Cogswell, F.B., Gwadz, R.W., Killickendrick, R., Wolf, R., Sinden, R., Koontz, L.C. et al. (1982).** Demonstration of Hypnozoites in Sporozoite-Transmitted Plasmodium-Vivax Infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 31, 1291-1293.

**Kubler-Kielb, J., Majadly, F., Biesova, Z., Mocca, C.P., Guo, C., Nussenzweig, R., Nussenzweig, V., Mishra, S., Wu, Y., Miller, L.H. et al. (2010).** A bicomponent Plasmodium falciparum investigational vaccine composed of protein-peptide conjugates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 1172-1177.

**Kubler-Kielb, J., Majadly, F., Wu, Y., Narum, D.L., Guo, C., Miller, L.H., Shiloach, J., Robbins, J.B., Schneerson, R. (2007).** Long-lasting and transmission-blocking activity of antibodies to Plasmodium falciparum elicited in mice by protein conjugates of Pfs25. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 293-298.

**Kumar, N., Carter, R. (1985).** Biosynthesis of two stage-specific membrane proteins during transformation of Plasmodium gallinaceum zygotes into ookinetes. *Molecular and biochemical parasitology* 14, 127-139.

**Kusnadi, A.R., Nikolov, Z.L., Howard, J.A. (1997).** Production of recombinant proteins in transgenic plants: Practical considerations. *Biotechnology and bioengineering* 56, 473-484.

**Lacroix, B., Li, J., Tzfira, T., Citovsky, V. (2006).** Will you let me use your nucleus? How Agrobacterium gets its T-DNA expressed in the host plant cell. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 84, 333-345.

**Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

**Lakshmi, D., Bahadur, B. (1997).** In vitro shoot multiplication in castor. *J. Phytol. Res.* 10, 1-4.

**Lal, A.A., Patterson, P.S., Sacci, J.B., Vaughan, J.A., Paul, C., Collins, W.E., Wirtz, R.A., Azad, A.F. (2001).** Anti-mosquito midgut antibodies block development of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax in multiple species of Anopheles mosquitoes and reduce vector fecundity and survivorship. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 5228-5233.

**Lau, O.S., Ng, D.W., Chan, W.W., Chang, S.P., Sun, S.S. (2010).** Production of the 42-kDa fragment of Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1, a leading malaria vaccine antigen, in Arabidopsis thaliana seeds. *Plant biotechnology journal* 8, 994-1004.

**LaVallie, E.R., DiBlasio, E.A., Kovacic, S., Grant, K.L., Schendel, P.F., McCoy, J.M. (1993).** A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the E. coli cytoplasm. *Bio/technology* 11, 187-193.

**Lawler, J., Hynes, R.O. (1986).** The structure of human thrombospondin, an adhesive glycoprotein with multiple calcium-binding sites and homologies with several different proteins. *The Journal of cell biology* 103, 1635-1648.

**Le-Nguyen, D., Nalis, D., Castro, B. (1989).** Solid phase synthesis of a trypsin inhibitor isolated from the Cucurbitaceae Ecballium elaterium. *International journal of peptide and protein research* 34, 492-497.

**Le Nguyen, D., Heitz, A., Chiche, L., Castro, B., Boigegrain, R.A., Favel, A., Coletti-Previero, M.A. (1990).** Molecular recognition between serine proteases and new bioactive microproteins with a knotted structure. *Biochimie* 72, 431-435.



**Lee, C., Kim, H.H., Choi, K.M., Chung, K.W., Choi, Y.K., Jang, M.J., Kim, T.S., Chung, N.J., Rhie, H.G., Lee, H.S. et al. (2011).** Murine immune responses to a *Plasmodium vivax*-derived chimeric recombinant protein expressed in *Brassica napus*. *Malaria journal* 10, 106.

**Lee, J.O., Rieu, P., Arnaout, M.A., Liddington, R. (1995).** Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell* 80, 631-638.

**Lingelbach, K., Joiner, K.A. (1998).** The parasitophorous vacuole membrane surrounding *Plasmodium* and *Toxoplasma*: An unusual compartment in infected cells. *J Cell Sci* 111, 1467-1475.

**Looker, M., Taylor-Robinson, A.W. (2008).** Rearing of *Anopheles stephensi* mosquitos. In: *Methods in Malaria Research*, 5<sup>th</sup> edition by Moll, K., Ljungström, I., Perlmann, H., Scherf, A., Wahlgren, M. (eds), 118-119.

**Lord, J.M., Roberts, L.M., Robertus, J.D. (1994).** Ricin: structure, mode of action, and some current applications. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 8, 201-208.

**Loughnan, M.S., Sanderson, C.J., Nossal, G.J. (1988).** Soluble interleukin 2 receptors are released from the cell surface of normal murine B lymphocytes stimulated with interleukin 5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 3115-3119.

**Ma, C., Wang, L., Webster, D.E., Campbell, A.E., Coppel, R.L. (2012).** Production, characterisation and immunogenicity of a plant-made *Plasmodium* antigen--the 19 kDa C-terminal fragment of *Plasmodium yoelii* merozoite surface protein 1. *Applied microbiology and biotechnology* 94, 151-161.

**Ma, J.K., Drake, P.M., Christou, P. (2003).** The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature reviews Genetics* 4, 794-805.

**Maliga, P. (2003).** Progress towards commercialization of plastid transformation technology. *Trends in biotechnology* 21, 20-28.

**Malkin, E.M., Durbin, A.P., Diemert, D.J., Sattabongkot, J., Wu, Y., Miura, K., Long, C.A., Lambert, L., Miles, A.P., Wang, J. et al. (2005).** Phase 1 vaccine trial of Pvs25H: a transmission blocking vaccine for *Plasmodium vivax* malaria. *Vaccine* 23, 3131-3138.

**Manda, H., Gouagna, L.C., Foster, W.A., Jackson, R.R., Beier, J.C., Githure, J.I., Hassanali, A. (2007).** Effect of discriminative plant-sugar feeding on the survival and fecundity of *Anopheles gambiae*. *Malaria journal* 6, 113.

**Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. Hrsg. (1989).** *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Marillonnet, S., Giritch, A., Gils, M., Kandzia, R., Klimyuk, V., Gleba, Y. (2004).** In planta engineering of viral RNA replicons: efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 6852-6857.

**Marillonnet, S., Thoeringer, C., Kandzia, R., Klimyuk, V., Gleba, Y. (2005).** Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nature biotechnology* 23, 718-723.

**Matuschewski, K. (2006).** Getting infectious: formation and maturation of *Plasmodium* sporozoites in the *Anopheles* vector. *Cell Microbiol* 8, 1547-1556.

**Matuschewski, K., Nunes, A.C., Nussenzweig, V., Menard, R. (2002).** *Plasmodium* sporozoite invasion into insect and mammalian cells is directed by the same dual binding system. *Embo J* 21, 1597-1606.

**McDonald, N.Q., Hendrickson, W.A. (1993).** A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell* 73, 421-424.

**McKeon, T.A., Chen, G.Q. (2003).** Transformation of *Ricinus communis*, the castor plant. US Patent No. 6,620,986 B1. Online verfügbar unter URL: <http://naldc.nal.usda.gov/download/6735/PDF> [15.04.2012].

**McNulty, J.C., Thompson, D.A., Bolin, K.A., Wilken, J., Barsh, G.S., Millhauser, G.L. (2001).** High-resolution NMR structure of the chemically-synthesized melanocortin receptor binding domain AGRP(87-132) of the agouti-related protein. *Biochemistry* 40, 15520-15527.

**Mendis, K., Sina, B.J., Marchesini, P., Carter, R. (2001).** The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 64, 97-106.

**Michishita, M., Videm, V., Arnaout, M.A. (1993).** A novel divalent cation-binding site in the A domain of the beta 2 integrin CR3 (CD11b/CD18) is essential for ligand binding. *Cell* 72, 857-867.

**Miller, L.H., Baruch, D.I., Marsh, K., Doumbo, O.K. (2002).** The pathogenic basis of malaria. *Nature* 415, 673-679.

**Molina, S.M., Schobert, C. (1995).** Micropropagation of *Ricinus communis*. *J Plant Physiol* 147, 270-272.

**Möller, M. (2010).** Etablierung bakterieller und pflanzlicher Expressionssysteme für Malaria-Antigene und Nanobody. Institut für Botanik, Technische Universität Darmstadt, Diplomarbeit.

**Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987).** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology* 155, 335-350.

**Murray-Rust, J., McDonald, N.Q., Blundell, T.L., Hosang, M., Oefner, C., Winkler, F., Bradshaw, R.A. (1993).** Topological similarities in TGF-beta 2, PDGF-BB and NGF define a superfamily of polypeptide growth factors. *Structure* 1, 153-159.

**Newbold, C., Craig, A., Kyes, S., Rowe, A., Fernandez-Reyes, D., Fagan, T. (1999).** Cytoadherence, pathogenesis and the infected red cell surface in *Plasmodium falciparum*. *International journal for parasitology* 29, 927-937.

**Nygren, P.A., Skerra, A. (2004).** Binding proteins from alternative scaffolds. *Journal of immunological methods* 290, 3-28.

**Ockenhouse, C.F., Ho, M., Tandon, N.N., Van Seventer, G.A., Shaw, S., White, N.J., Jamieson, G.A., Chulay, J.D., Webster, H.K. (1991).** Molecular basis of sequestration in severe and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria: differential adhesion of infected erythrocytes to CD36 and ICAM-1. *The Journal of infectious diseases* 164, 163-169.

**Okulate, M.A., Kalume, D.E., Reddy, R., Kristiansen, T., Bhattacharyya, M., Chaerkady, R., Pandey, A., Kumar, N. (2007).** Identification and molecular characterization of a novel protein Saglin as a target of monoclonal antibodies affecting salivary gland infectivity of *Plasmodium* sporozoites. *Insect Mol Biol* 16, 711-722.

**Ollmann, M.M. (1998).** Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by Agouti-related protein (vol 280, pg 135, 1997). *Science* 281, 1615-1615.

**Ollmann, M.M., Wilson, B.D., Yang, Y.K., Kerns, J.A., Chen, Y., Gantz, I., Barsh, G.S. (1997).** Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 278, 135-138.

**Pain, A., Bohme, U., Berry, A.E., Mungall, K., Finn, R.D., Jackson, A.P., Mourier, T., Mistry, J., Pasini, E.M., Aslett, M.A. *et al.* (2008).** The genome of the simian and human malaria parasite *Plasmodium knowlesi*. *Nature* 455, 799-803.

**Pallaghy, P.K., Nielsen, K.J., Craik, D.J., Norton, R.S. (1994).** A common structural motif incorporating a cystine knot and a triple-stranded beta-sheet in toxic and inhibitory polypeptides. *Protein science : a publication of the Protein Society* 3, 1833-1839.

**Pasquevich, K.A., Garcia Samartino, C., Coria, L.M., Estein, S.M., Zwerdling, A., Ibanez, A.E., Barrionuevo, P., Oliveira, F.S., Carvalho, N.B., Borkowski, J. *et al.* (2010).** The protein moiety of *Brucella abortus* outer membrane protein 16 is a new bacterial pathogen-associated molecular pattern that activates dendritic cells in vivo, induces a Th1 immune response, and is a promising self-adjuvanting vaccine against systemic and oral acquired brucellosis. *Journal of immunology* 184, 5200-5212.

**Pastorello, E.A., Pompei, C., Pravettoni, V., Brenna, O., Farioli, L., Trambaioli, C., Conti, A. (2001).** Lipid transfer proteins and 2S albumins as allergens. *Allergy* 56 Suppl 67, 45-47.

**Paton, M.G., Barker, G.C., Matsuoka, H., Ramesar, J., Janse, C.J., Waters, A.P., Sinden, R.E. (1993).** Structure and expression of a post-transcriptionally regulated malaria gene encoding a surface protein from the sexual stages of *Plasmodium berghei*. *Molecular and biochemical parasitology* 59, 263-275.

**Pimenta, P.F., Touray, M., Miller, L. (1994).** The journey of malaria sporozoites in the mosquito salivary gland. *The Journal of eukaryotic microbiology* 41, 608-624.

**Pimentel, C., Choi, S.J., Chagot, B., Guette, C., Camadro, J.M., Darbon, H. (2006).** Solution structure of PcFK1, a spider peptide active against *Plasmodium falciparum*. *Protein Sci* 15, 628-634.

**Pradel, G. (2007).** Proteins of the malaria parasite sexual stages: expression, function and potential for transmission blocking strategies. *Parasitology* 134, 1911-1929.

**Prinz, W.A., Aslund, F., Holmgren, A., Beckwith, J. (1997).** The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *The Journal of biological chemistry* 272, 15661-15667.

**Protalix Biotherapeutics (2012).** Product development ELELYSO™. Protalix Biotherapeutics, website, <http://www.protalix.com/product-development/elelyso.asp> [14.11.2012]

**Prudencio, M., Rodriguez, A., Mota, M.M. (2006).** The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nat Rev Microbiol* 4, 849-856.

**Qian, F., Wu, Y., Muratova, O., Zhou, H., Dobrescu, G., Duggan, P., Lynn, L., Song, G., Zhang, Y., Reiter, K., et al. (2007).** Conjugating recombinant proteins to *Pseudomonas aeruginosa* ExoProtein A: a strategy for enhancing immunogenicity of malaria vaccine candidates. *Vaccine* 25, 3923-3933.

**Ramirez, J.L., Garver, L.S., Dimopoulos, G. (2009).** Challenges and Approaches for Mosquito Targeted Malaria Control. *Curr Mol Med* 9, 116-130.

**Rawlings, D.J., Kaslow, D.C. (1992).** Adjuvant-dependent immune response to malarial transmission-blocking vaccine candidate antigens. *The Journal of experimental medicine* 176, 1483-1487.

**Reddy, K.R.K., Bahadur, B. (1989).** Adventitious bud formation from leaf cultures of castor (*Ricinus communis* L.). *Curr Sci* 58, 152-154.

**Reddy, K.R.K., Rao, G.P., Bahadur, B. (1987).** In vitro morphogenesis from seedling explants and callus cultures of castor (*Ricinus communis* L.). *Phytomorphology* 37, 337-340.

**Ridley, R.G. (2002).** Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature* 415, 686-693.

**Robson, K.J., Hall, J.R., Jennings, M.W., Harris, T.J., Marsh, K., Newbold, C.I., Tate, V.E., Weatherall, D.J. (1988).** A highly conserved amino-acid sequence in thrombospondin, properdin and in proteins from sporozoites and blood stages of a human malaria parasite. *Nature* 335, 79-82.

**Rosenberg, R. (1985).** Inability of *Plasmodium knowlesi* sporozoites to invade *Anopheles freeborni* salivary glands. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 34, 687-691.

**Rybicki, E.P. (2009).** Plant-produced vaccines: promise and reality. *Drug discovery today* 14, 16-24.

**Saether, O., Craik, D.J., Campbell, I.D., Sletten, K., Juul, J., Norman, D.G. (1995).** Elucidation of the primary and three-dimensional structure of the uterotonic polypeptide kalata B1. *Biochemistry* 34, 4147-4158.

**Sangduen, N., Pongtongkam, P., Ratisoontorn, P., Jampatas, R., Suputtitada, S., Khumsub, S. (1987).** Tissue culture and plant regeneration of castor (*Ricinus communis* L.). *SABRAO J* 19, 144.

**Santi, L., Batchelor, L., Huang, Z., Hjelm, B., Kilbourne, J., Arntzen, C.J., Chen, Q., Mason, H.S. (2008).** An efficient plant viral expression system generating orally immunogenic Norwalk virus-like particles. *Vaccine* 26, 1846-1854.

**Santi, L., Giritich, A., Roy, C.J., Marillonnet, S., Klimyuk, V., Gleba, Y., Webb, R., Arntzen, C.J., Mason, H.S. (2006).** Protection conferred by recombinant *Yersinia pestis* antigens produced by a rapid and highly scalable plant expression system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 861-866.

**Sarvesh, A., Ram Rao, D.M., Reddy, T.P. (1992).** Callus initiation and plantlet regeneration from epicotyl and cotyledonary explants of castor (*Ricinus communis* L.). *Adv Plant Sci* 5, 124-128.

**Sauerwein, R.W., Eling, W.M. (2002).** Sexual and sporogonic stage antigens. *Chemical immunology* 80, 188-203.

**Saxena, A.K., Wu, Y., Garboczi, D.N. (2007).** Plasmodium p25 and p28 surface proteins: potential transmission-blocking vaccines. *Eukaryotic cell* 6, 1260-1265.

**Schillberg, S., Zimmermann, S., Voss, A., Fischer, R. (1999).** Apoplastic and cytosolic expression of full-size antibodies and antibody fragments in *Nicotiana tabacum*. *Transgenic research* 8, 255-263.

**Schlitzer, M. (2009).** Medizinische Chemie der Wirkstoffe gegen Malaria. *Pharm. Uns. Zeit* 38, 512-520.

**Schlitzer, M. (2010).** Malaria: Lebensrettende Prophylaxe und Therapie. *Pharmazeutische Zeitung* 12, 2010. Online unter URL: <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=33154> [20.07.2012]

**Schmoltdt, H.-U. (2005).** Neue Enzyminhibitoren und Rezeptoragonisten durch Variation funktionaler Schleifen von Mikroproteinen. Georg-August-Universität Göttingen, Dissertation.

**Scholz, S.M., Simon, N., Lavazec, C., Dude, M.A., Templeton, T.J., Pradel, G. (2008).** PfCCp proteins of *Plasmodium falciparum*: gametocyte-specific expression and role in complement-mediated inhibition of exflagellation. *International journal for parasitology* 38, 327-340.

**Schwartz, L., Brown, G.V., Genton, B., Moorthy, V.S. (2012).** A review of malaria vaccine clinical projects based on the WHO rainbow table. *Malaria journal* 11, 11.

**Severino, L.S., Auld, D.L., Baldanzi, M., Cândido, M., Chen, G., Crosby, W., Tan, D., Xiaohua He, Lakshamma, P., Lavanya, C. et al. (2012).** A Review on the Challenges for Increased Production of Castor. *Agronomy Journal*. doi:10.2134/agronj2011.0210. *Agronomy Journal* 2012, 104:4, 853-880.

**Shahabuddin, M., Pimenta, P.F. (1998).** *Plasmodium gallinaceum* preferentially invades vesicular ATPase-expressing cells in *Aedes aegypti* midgut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 3385-3389.

**Shewry, P.R., Beaudoin, F., Jenkins, J., Griffiths-Jones, S., Mills, E.N. (2002).** Plant protein families and their relationships to food allergy. *Biochemical Society transactions* 30, 906-910.

**Siden-Kiamos, I., Louis, C. (2004).** Interactions between malaria parasites and their mosquito hosts in the midgut. *Insect biochemistry and molecular biology* 34, 679-685.

**Siden-Kiamos, I., Vlachou, D., Margos, G., Beetsma, A., Waters, A.P., Sinden, R.E., Louis, C. (2000).** Distinct roles for pbs21 and pbs25 in the in vitro ookinete to oocyst transformation of *Plasmodium berghei*. *Journal of cell science* 113 Pt 19, 3419-3426.

**Sieber, K.P., Huber, M., Kaslow, D., Banks, S.M., Torii, M., Aikawa, M., Miller, L.H. (1991).** The peritrophic membrane as a barrier: its penetration by *Plasmodium gallinaceum* and the effect of a monoclonal antibody to ookinetes. *Experimental parasitology* 72, 145-156.

**Sinden, R.E., Winger, L., Carter, E.H., Hartley, R.H., Tirawanchai, N., Davies, C.S., Moore, J., Sluiter, J.F. (1987).** Ookinete antigens of *Plasmodium berghei*: a light and electron-microscope immunogold study of expression of the 21 kDa determinant recognized by a transmission-blocking antibody. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Containing papers of a Biological character Royal Society* 230, 443-458.

**Sjolund, R.D. (1997).** The Phloem Sieve Element: A River Runs through It. *The Plant cell* 9, 1137-1146.

**Skerra, A. (2000).** Engineered protein scaffolds for molecular recognition. *Journal of molecular recognition : JMR* 13, 167-187.

**Smith, J.D., Chitnis, C.E., Craig, A.G., Roberts, D.J., Hudson-Taylor, D.E., Peterson, D.S., Pinches, R., Newbold, C.I., Miller, L.H. (1995).** Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell* 82, 101-110.

**Stadler, R., Wright, K.M., Lauterbach, C., Amon, G., Gahrtz, M., Feuerstein, A., Oparka, K.J., Sauer, N. (2005).** Expression of GFP-fusions in *Arabidopsis* companion cells reveals non-specific protein trafficking into sieve elements and identifies a novel post-phloem domain in roots. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 41, 319-331.

**Staines, H.M., Ellory, J.C., Kirk, K. (2001).** Perturbation of the pump-leak balance for Na(+) and K(+) in malaria-infected erythrocytes. *American journal of physiology Cell physiology* 280, C1576-1587.

**Staub, J.M., Garcia, B., Graves, J., Hajdukiewicz, P.T., Hunter, P., Nehra, N., Paradkar, V., Schlittler, M., Carroll, J.A., Spatola, L., *et al.* (2000).** High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nature biotechnology* 18, 333-338.

**Sterling, C.R., Aikawa, M., Vanderberg, J.P. (1973).** The passage of *Plasmodium berghei* sporozoites through the salivary glands of *Anopheles stephensi*: an electron microscope study. *The Journal of parasitology* 59, 593-605.

**Stewart, E.J., Aslund, F., Beckwith, J. (1998).** Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins. *The EMBO journal* 17, 5543-5550.

**Stich, A., Schlitzer, M. (2008).** Wirkstoffe zur Therapie und Prophylaxe der Malaria. *Chemother. J.* 17, 4, 37-56.

**Streatfield, S.J. (2007).** Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants. *Plant biotechnology journal* 5, 2-15.

**Studier, F.W., Moffatt, B.A. (1986).** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of molecular biology* 189, 113-130.

**Su, X.Z., Heatwole, V.M., Wertheimer, S.P., Guinet, F., Herrfeldt, J.A., Peterson, D.S., Ravetch, J.A., Wellems, T.E. (1995).** The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell* 82, 89-100.

**Sujatha, M., Reddy, T.P. (1998).** Differential cytokinin effects on the stimulation of in vitro shoot proliferation from meristematic explants of castor (*Ricinus communis* L.). *Plant Cell Rep* 17, 561-566.

**Sujatha, M., Reddy, T.P., Mahasi, M.J. (2008).** Role of biotechnological interventions in the improvement of castor (*Ricinus communis* L.) and *Jatropha curcas* L. *Biotechnology advances* 26, 424-435.

**Sujatha, M., Sailaja, M. (2005).** Stable genetic transformation of castor (*Ricinus communis* L.) via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer using embryo axes from mature seeds. *Plant cell reports* 23, 803-810.

**Sultan, A.A., Thathy, V., de Koning-Ward, T.F., Nussenzweig, V. (2001).** Complementation of *Plasmodium berghei* TRAP knockout parasites using human dihydrofolate reductase gene as a selectable marker. *Molecular and biochemical parasitology* 113, 151-156.

**Sultan, A.A., Thathy, V., Frevert, U., Robson, K.J., Crisanti, A., Nussenzweig, V., Nussenzweig, R.S., Menard, R. (1997).** TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of *plasmodium* sporozoites. *Cell* 90, 511-522.

**Tan Thanh Huynh (2009).** Identifizierung, Klonierung und Aufreinigung von potentiellen Inhibitoren des Malariaerregers *Plasmodium spec.* Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie, Technische Universität Darmstadt, Diplomarbeit.

**Taylor, R.M., Foster, W.A. (1996).** Spider nectarivory. *American Entomologist* 42, 82-86.

**Teh, Y.H., Kavanagh, T.A. (2010).** High-level expression of Camelid nanobodies in *Nicotiana benthamiana*. *Transgenic research* 19, 575-586.

**Templeton, T.J., Kaslow, D.C., Fidock, D.A. (2000).** Developmental arrest of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* within the mosquito midgut via CTRP gene disruption. *Molecular microbiology* 36, 1-9.

**Terlau, H., Olivera, B.M. (2004).** Conus venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiological reviews* 84, 41-68.

**Thongyoo, P., Roque-Rosell, N., Leatherbarrow, R.J., Tate, E.W. (2008).** Chemical and biomimetic total syntheses of natural and engineered MCoTI cyclotides. *Organic & biomolecular chemistry* 6, 1462-1470.

**Tomas, A.M., Margos, G., Dimopoulos, G., van Lin, L.H.M., de Koning-Ward, T.F., Sinha, R., Lupetti, P., Beetsma, A.L., Rodriguez, M.C., Karras, M., et al. (2001).** P25 and P28 proteins of the malaria ookinete surface have multiple and partially redundant functions. *Embo J* 20, 3975-3983.

**Trabi, M., Craik, D.J. (2002).** Circular proteins--no end in sight. *Trends in biochemical sciences* 27, 132-138.

**Trottein, F., Triglia, T., Cowman, A.F. (1995).** Molecular cloning of a gene from *Plasmodium falciparum* that codes for a protein sharing motifs found in adhesive molecules from mammals and plasmodia. *Molecular and biochemical parasitology* 74, 129-141.

**Tsuboi, T., Cao, Y.M., Hitsumoto, Y., Yanagi, T., Kanbara, H., Torii, M. (1997a).** Two antigens on zygotes and ookinetes of *Plasmodium yoelii* and *Plasmodium berghei* that are distinct targets of transmission-blocking immunity. *Infection and immunity* 65, 2260-2264.

**Tsuboi, T., Cao, Y.M., Kaslow, D.C., Shiwaku, K., Torii, M. (1997b).** Primary structure of a novel ookinete surface protein from *Plasmodium berghei*. *Molecular and biochemical parasitology* 85, 131-134.

**Tsuboi, T., Kaslow, D.C., Gozar, M.M., Tachibana, M., Cao, Y.M., Torii, M. (1998).** Sequence polymorphism in two novel *Plasmodium vivax* ookinete surface proteins, Pvs25 and Pvs28, that are malaria transmission-blocking vaccine candidates. *Molecular medicine* 4, 772-782.

**Tsuboi, T., Tachibana, M., Kaneko, O., Torii, M. (2003).** Transmission-blocking vaccine of vivax malaria. *Parasitology international* 52, 1-11.

**Tucker, R.P. (2004).** The thrombospondin type 1 repeat superfamily. *The international journal of biochemistry & cell biology* 36, 969-974.

**Tuteja, R. (2007).** Malaria - an overview. *Febs J* 274, 4670-4679.

**Twyman, R.M., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P., Fischer, R. (2003).** Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends in biotechnology* 21, 570-578.

**Tzfira, T., Citovsky, V. (2006).** Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current opinion in biotechnology* 17, 147-154.

**Vermeulen, A.N., Ponnudurai, T., Beckers, P.J., Verhave, J.P., Smits, M.A., Meuwissen, J.H. (1985).** Sequential expression of antigens on sexual stages of *Plasmodium falciparum* accessible to transmission-blocking antibodies in the mosquito. *The Journal of experimental medicine* 162, 1460-1476.

**Vermeulen, A.N., van Deursen, J., Brakenhoff, R.H., Lensen, T.H., Ponnudurai, T., Meuwissen, J.H. (1986).** Characterization of *Plasmodium falciparum* sexual stage antigens and their biosynthesis in synchronised gametocyte cultures. *Molecular and biochemical parasitology* 20, 155-163.

**Vlachou, D., Lycett, G., Siden-Kiamos, I., Blass, C., Sinden, R.E., Louis, C. (2001).** Anopheles gambiae laminin interacts with the P25 surface protein of *Plasmodium berghei* ookinetes. *Molecular and biochemical parasitology* 112, 229-237.



- Wan, K.L., Carruthers, V.B., Sibley, L.D., Ajioka, J.W. (1997).** Molecular characterisation of an expressed sequence tag locus of *Toxoplasma gondii* encoding the micronemal protein MIC2. *Molecular and biochemical parasitology* 84, 203-214.
- Wang, L., Webster, D.E., Campbell, A.E., Dry, I.B., Wesselingh, S.L., Coppel, R.L. (2008).** Immunogenicity of *Plasmodium yoelii* merozoite surface protein 4/5 produced in transgenic plants. *International journal for parasitology* 38, 103-110.
- Wang, W., Vignani, R., Scali, M., Cresti, M. (2006).** A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis* 27, 2782-2786.
- Warzecha, H. (2008).** Biopharmaceuticals from plants: a multitude of options for posttranslational modifications. *Biotechnology & genetic engineering reviews* 25, 315-330.
- Webster, D.E., Wang, L., Mulcair, M., Ma, C., Santi, L., Mason, H.S., Wesselingh, S.L., Coppel, R.L. (2009).** Production and characterization of an orally immunogenic *Plasmodium* antigen in plants using a virus-based expression system. *Plant biotechnology journal* 7, 846-855.
- Weiss, E.A. (2000).** Castor. In: *Oilseed crops*. 2<sup>nd</sup> Edition, Blackwell Science Ltd, Oxford. 13-52.
- Wengelnik, K., Spaccapelo, R., Naitza, S., Robson, K.J.H., Janse, C.J., Bistoni, F., Waters, A.P., Crisanti, A. (1999).** The A-domain and the thrombospondin-related motif of *Plasmodium falciparum* TRAP are implicated in the invasion process of mosquito salivary glands. *Embo J* 18, 5195-5204.
- White, N.J. (2011).** A vaccine for malaria. *The New England journal of medicine* 365, 1926-1927.
- Whittaker, C.A., Hynes, R.O. (2002).** Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Molecular biology of the cell* 13, 3369-3387.
- WHO (2012a).** World Malaria Report 2011. World Health Organization, website, [http://www.who.int/malaria/world\\_malaria\\_report\\_2011/en/](http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/en/) [27.06.2012]
- WHO (2012b).** Malaria fact sheet N°94, April 2012. World Health Organization, website, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/index.html> [27.6.2012]
- Winger, L.A., Tirawanchai, N., Nicholas, J., Carter, H.E., Smith, J.E., Sinden, R.E. (1988).** Ookinete antigens of *Plasmodium berghei*. Appearance on the zygote surface of an Mr 21 kD determinant identified by transmission-blocking monoclonal antibodies. *Parasite immunology* 10, 193-207.
- Wirth, D.F. (2002).** The parasite genome: Biological revelations. *Nature* 419, 495-496.
- Wu, Y., Przysiecki, C., Flanagan, E., Bello-Irizarry, S.N., Ionescu, R., Muratova, O., Dobrescu, G., Lambert, L., Keister, D., Rippeon, Y., *et al.* (2006).** Sustained high-titer antibody responses induced by conjugating a malarial vaccine candidate to outer-membrane protein complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 18243-18248.

**Yang, Y.K., Thompson, D.A., Dickinson, C.J., Wilken, J., Barsh, G.S., Kent, S.B., Gantz, I. (1999).** Characterization of Agouti-related protein binding to melanocortin receptors. *Molecular endocrinology* 13, 148-155.

**Zieler, H., Dvorak, J.A. (2000).** Invasion in vitro of mosquito midgut cells by the malaria parasite proceeds by a conserved mechanism and results in death of the invaded midgut cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 11516-11521.

**Zimran, A., Brill-Almon, E., Chertkoff, R., Petakov, M., Blanco-Favela, F., Terreros Muñoz, E., Solorio-Meza, S.E., Amato, D., Duran, G., Giona, F., *et al.* (2011).** Pivotal trial with plant cell-expressed recombinant glucocerebrosidase, taliglucerase alfa, a novel enzyme replacement therapy for Gaucher disease. *Blood* 118, 5767-5773.

[1] [www.rbm.who.int/gmap/2-1.html](http://www.rbm.who.int/gmap/2-1.html) [27.06.2012]

[2] [www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01434381](http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01434381) [29.8.2012]

[3] [www.fitoapteka.org/herbs-k/3723-101017-ricinus-communis](http://www.fitoapteka.org/herbs-k/3723-101017-ricinus-communis) [14.11.2012]

## **8. Anhang**

Die für diese Arbeit relevanten Vektorkarten, Sequenzen und Rohdaten sind der im Einband der *print*-Version beigefügten CD-ROM zu entnehmen.



## Danksagung

Mein Dank geht zuerst an Herrn Prof. Dr. Heribert Warzecha für die Bereitstellung dieses Projekts und die Möglichkeit der Bearbeitung dieses spannenden Themas. Danke für dein Vertrauen, deine Betreuung und Unterstützung und deine stets positive Einstellung.

Herrn Prof. Dr. Adam Bertl danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und seine stete Hilfsbereitschaft.

Der „*Bill & Melinda Gates Foundation*“ danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit (*Grand Challenges Explorations Grant*; Projekt: *Sweet medicine for vectors transmitting infectious diseases*).

PD Dr. Gabriele Pradel und ihren Mitarbeitern, ganz besonders Dr. Matthias Scheuermayer und Che Julius Ngwa, danke ich für die Kooperation sowie die Unterstützung bei der Zucht von *Anopheles* und die Durchführung der Fütterungsexperimente. Ein großes Dankeschön für all die zusätzliche Arbeit.

Auch Herrn Prof. Dr. Harald Kolmar und seiner Arbeitsgruppe, insbesondere Than und Caro, danke ich für die Zusammenarbeit sowie den regen Austausch von Materialien oder Methoden.

Mein herzlicher Dank geht an meine Laborkollegen, ganz besonders an Suse, Anna und Christine sowie Henning und Sabine für den schönen Laboralltag, eure Unterstützung und Hilfsbereitschaft, für gemeinsames Lachen und Schimpfen. Ein großes Dankeschön besonders an Christine für die Hilfe bei den Moskitos und beim Infiltrieren. Danke auch an die AG Thiel für das Mitbenutzen oder Ausleihen von Geräten und Chemikalien sowie die gute „Nachbarschaft“.

Ich danke auch allen Praktikanten, Bacheloranten, Diplomanden und Wissenschaftlern, die in irgendeiner Form zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ich möchte an dieser Stelle besonders Prof. Dr. Kai Matuschewski für die Bereitstellung von DNA-Material zu Beginn dieser Arbeit, Prof. Dr. Norbert Sauer für die Bereitstellung Plasmids pAF12, sowie Dr. Yvonne Reinders für die MS-Untersuchung des *Ricinus*-Nektars danken. Den Gärtnern der TUD danke ich für die Bereitstellung des Pflanzenmaterials.

Danken möchte ich außerdem meinen Kollegen aus der „Apotheke am ZOB“, insbesondere Frau Gertrud Schwager-Karl, für das Verständnis und die gute Zusammenarbeit während der schriftlichen Phase der Arbeit.

Meiner Familie danke ich für die mentale und finanzielle Unterstützung, für eure Liebe, dass ihr immer an mich geglaubt, mich notfalls wieder motiviert und mir zugehört habt. MaPa, euch danke ich besonders, denn ihr habt mir dies alles überhaupt erst möglich gemacht.

Jubbe, dir möchte ich auch ganz besonders danken: ohne deine unendliche Geduld, deine Liebe und deinen ständigen Zuspruch und Ansporn wäre diese Arbeit vielleicht gar nicht erst entstanden. Danke für dein Verständnis und dafür, dass du so bist wie du bist.

## Publikationsliste und Beiträge zu Tagungsbänden

**Reichwein, S., Warzecha, H., Arora, R. (ed.) (2010):** *Novel medicinal plants for the production and delivery of vaccines*. In: Medicinal plant biotechnology. CABI, pp. 287-302. ISBN 978-1-84593-678-5; Buchkapitel.

**Reichwein, S., Warzecha, H. (2008):** *Non-Hodgkin's lymphoma: personalized therapy with plants*. In: Pharmazie in unserer Zeit, 37 (6) p. 448. ISSN 0048-3664.

### Beiträge zu Tagungsbänden:

**Reichwein, S., Warzecha, H. (2009):** *Expression of antiplasmodial proteins in the phloem and nectar of Ricinus*. Posterpräsentation, Tagung der Gesellschaft für Pflanzenbiotechnologie, Rostock.

**Reichwein, S., Matuschewski, K., Warzecha H. (2008):** *Expression of Plasmodium Circumsporozoite Proteins (CSP) in Tobacco Plants*. Posterpräsentation, Tagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), Bonn.





## Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der *online*-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.



## Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe. Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und noch nicht veröffentlicht.

Darmstadt, den 21.11.2012

.....  
Simone Reichwein